

Aus der Abteilung
Medizinische Klinik und Poliklinik I
Molekulare Kardiologie
am Fachbereich Humanmedizin
der Justus-Liebig-Universität Gießen

Funktionelle Bedeutung der miRNA Expression während der Entstehung der Atherosklerose und Restenose

Inauguraldissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der naturwissenschaftlichen Fachbereiche
(Fachbereich Biologie und Chemie)
der Justus-Liebig-Universität Gießen

vorgelegt von
Diplom.Biochem. Wiebke Bielenberg
aus Hamburg

Gießen 2009

Dekan: Prof. Dr. Volkmar Wolters

1. Berichterstatter: Prof. Dr. W. Clauß

2. Berichterstatter: Prof. Dr. H.H. Tillmanns

Tag der mündlichen Prüfung:

**„ Je weiter sich das Wissen ausbreitet, desto mehr Probleme
kommen zum Vorschein.“** Johann Wolfgang von Goethe

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung	1
1.1 Grundlagen der Atherosklerose	2
1.2 Remodeling	5
1.3 Grundlagen der Restenose	5
1.4 Therapie vaskuloproliferativer Erkrankungen	7
1.5 miRNAs	9
1.6 miRNAs, Synthese und Funktion	10
1.7 Dicer und Drosha im Kardiovaskulären System	11
1.8 miRNAs in vaskulären Erkrankungen	12
2. Fragestellung	15
3. Material und Methoden	16
3.1 Geräte	16
3.2 Chemikalien und Medien	17
3.3 Medikamente und Narkotika	18
3.4 Substanzen	18
3.5 Zellkultur	18
3.6 Isolation von Monozyten/Makrophagen aus Blut	19
3.7 Proteomics	20
3.7.1 Protein Isolation	20
3.7.2 Western Blot	20
3.8 Genomics	24
3.8.1 RNA Isolation	24
3.8.2 miRNA Isolation	25
3.8.3 Reverse Transkription	26
3.8.3.1 Reverse Transkription: RNA	26
3.8.3.2 Reverse Transkription: miRNA	27
3.8.4 Real-time PCR	27
3.8.4.1 Real-time PCR: RNA	28
3.8.4.2 Real-time PCR: miRNA	29

3.8.5	PCR Array	29
3.8.6	Chromatin Immunpräzipitation (ChIP).....	30
3.8.7	Microarray	34
3.8.7.1	Microarray: miRNA.....	35
3.8.8	RNAi – RNA Interferenz.....	35
3.8.8.1	Transfektion mit siRNA	35
3.8.8.2	Reverse Transfektion mit miRNA-Precursorn	36
3.8.8.3	Reverse Transfektion mit miRNA-Inhibitoren.....	37
3.8.8.4	<i>In vivo</i> Transfektion.....	38
3.8.9	Virus Transduktion	38
3.9	Funktionelle Assays.....	40
3.9.1	Proliferationsassay	40
3.9.2	Migrationsassay	41
3.9.3	Apoptoseassay	42
3.10	Tierexperimentelle Arbeiten	43
3.10.1	Narkose	43
3.10.2	Dilatation	43
3.10.3	Fixierung der Gefäße	45
3.10.4	Gefäßentnahme	45
3.11	Anfertigen und Färben von Gefäßschnitten.....	46
3.11.1	Anfertigen von Gefäßschnitten.....	46
3.11.2	Immunhistochemie	46
3.11.3	Morphometrie der Gefäßschnitte	47
3.11.4	Immunhistochemischer Nachweis von proliferierenden Zellen..	48
3.12	Durchflusszytometrie.....	49
3.13	Statistik	49

4. Ergebnisse	50
4.1 Der Einfluss der miRNA-prozessierenden Enzyme Dicer und Drosha auf die Funktion glatter Gefäßmuskelzellen	50
4.1.1 Regulation der Expression von Dicer und Drosha während der Atherosklerose und Restenose	50
4.1.2 Dicer und Drosha regulieren die Proliferation und Migration, aber nicht Apoptose in SMCs	51
4.1.3 Herunterregulation von Drosha führt zu einer verstärkten Expression von Genen der Zellzyklusregulation	55
4.1.4 Proliferative Stimuli induzieren eine reduzierte Expression von Dicer und Drosha	57
4.1.5 Analyse der transkriptionellen Regulation der Dicer Expression	59
4.1.5.1 <i>In silico</i> Analyse der Promoterregion von Dicer	59
4.1.5.2 FoxO1 wird in SMCs exprimiert und über die PI3K reguliert	61
4.1.5.3 FoxO1 hemmt die Proliferation von SMCs	63
4.1.5.4 Experimentelle Analyse der Promoterregion von Dicer	64
4.1.6 Knockdown von Dicer und Drosha <i>in vivo</i> führt zu verstärkter Proliferation von SMCs und Neointimabildung	67
4.2 Einfluss von miRNAs auf vaskuloproliferierende Erkrankungen	70
4.2.1 Die miRNA-Expression während der Atherosklerose & Restenose	70
4.2.2 Proliferative, apoptotische und inflammatorische Stimuli und ihre Wirkung auf die miRNA Expression in SMCs	76
4.2.3 miR-146a	79
4.2.3.1 Die funktionelle Bedeutung von hsa-miR-146a <i>in vitro</i>	80
4.2.4 miR-143/145	81
4.2.4.1 Die funktionelle Bedeutung von miR-143/145 <i>in vitro</i> in SMCs	82
4.2.4.2 Die funktionelle Bedeutung von miR-143/145 <i>in vitro</i> in ECs	84
4.2.4.3 MiR-143/145 regulieren die Expression von Zellzyklusgenen	86
4.3 Etablierung einer <i>in vivo</i> Transfektionsmethode zum Knockdown von miRNAs	87

5. Diskussion	90
5.1 Diskussion der <i>in vivo</i> Modelle	92
5.1.1 Restenose: Dilatation der Femoralarterie in C57BL6/N Mäusen	92
5.1.2 Atherosklerose: ApoE/LDL ^{-/-} Mäuse	93
5.2 Die Bedeutung von Dicer und Drosha – und damit der Expression von miRNAs - für vaskuloproliferative Erkrankungen	95
5.2.1 Expression von Dicer und Drosha <i>in vivo</i> und die funktionelle Bedeutung der Expression <i>in vitro</i>	96
5.2.2 Regulationsmechanismen der Expression von Dicer und Drosha	97
5.2.3 Bedeutung von Dicer und Drosha <i>in vivo</i> für die Neointimaentstehung	101
5.2.4 Mögliche Ursachen der zellspezifischen miRNA Expression	101
5.3 Expressionsprofile von miRNAs während vaskuloproliferativer Erkrankungen <i>in vivo</i> und Expressionsregulationen infolge der wichtigsten <i>in vivo</i> auftretenden Stimuli <i>in vitro</i>	102
5.3.1 Die Expression und Funktion von miR-146a	105
5.3.2 Die Expression und Funktion von miR-143/145	106
5.5 Ausblick	109
 6.1 Zusammenfassung	 111
6.2 Summary	114
7. Literaturverzeichnis	117
8. Abkürzungsverzeichnis	126
9. Publikationen	128
9.1 Veröffentlichungen	128
9.2 Vorträge und Posterpräsentationen	128
9.2.1 Vorträge	128
9.2.2 Posterpräsentationen	129
9.2.3 Ko-Autorenschaften	130
9.3 Preise	131
10. Lebenslauf	132
11. Danksagung	134

1. Einleitung

Nach den Ergebnissen der "MONItoring Trends and Determinants in Cardiovascular Disease" (MONICA) Studie der Weltgesundheitsbehörde (WHO) stellen Herz-Kreislauf-erkrankungen, die auf vaskuloproliferative Erkrankungen zurückzuführen sind, immer noch die Haupt-Todesursache in der westlichen Welt dar.¹ Die gegenwärtigen präventiven oder therapeutischen Strategien konzentrieren sich dabei auf eine Reduktion der Risikofaktoren (wie z.B. der Hypercholesterinämie, des Bluthochdruckes oder des Diabetes mellitus) oder eine therapeutische Wiederherstellung des Blutflusses mittels Angioplastie oder chirurgischer Revaskularisation (Bypass-Operation).

Invasiv-revaskularisierende Maßnahmen sind jedoch durch einen hohen Prozentsatz von Wiederverschlüssen der betroffenen Gefäße limitiert:

Bei 30-50% der Patienten, die eine perkutane transluminale Koronarangioplastie (PTCA) erhalten haben, kommt es bereits in den ersten Monaten nach dem Eingriff zur Restenose der dilatierten Gefäße.^{2, 3} Auch die in jüngerer Zeit entwickelten Gefäßprothesen (Stents) verhindern zwar das unmittelbare Wiederausdehnen des Gefäßes nach Angioplastie (elastisches Recoil), verstärken jedoch sogar die Proliferation intimaler Zellen und sind immer noch mit einer unakzeptabel hohen Zahl an Restenosen (~30%) behaftet.⁴ 20% der Patienten, bei denen es zur Restenose eines dilatierten Gefäßes gekommen ist, benötigen letztlich eine Bypassoperation. Auch hier kommt es jedoch jährlich in 10-30% der Fälle zu einem Transplantatversagen aufgrund einer Stenosierung der verpflanzten Gefäße.⁵ Auffällig ist, dass hauptsächlich die venösen Bypässe von dieser Stenosierung betroffen sind, während die arteriellen Transplantate ein deutlich längeres Überleben zeigen. Hierfür werden zum Großteil die veränderten Druckverhältnisse verantwortlich gemacht, da die Venen nach Verpflanzung in den arteriellen Kreislauf etwa dem zehnfachen an Gefäßdehnung und Druckbelastung ausgesetzt sind. Die genauen pathophysiologischen Zusammenhänge sind jedoch noch weitgehend ungeklärt.

1.1 Grundlagen der Atherosklerose

Die Atherosklerose und ihre Folgeerkrankungen stellen mittlerweile die häufigste Todesursache in den westlichen Industrienationen dar. Problematisch an dieser allgemeinen Erkrankung des Arteriensystems ist, dass sie sich langsam entwickelt und über Jahre und Jahrzehnte symptomlos verläuft, bis sie sich durch Ischämie, Thrombose, Angina Pectoris, Herzinfarkt, Schlaganfall oder plötzlichen Herztod manifestiert. Kennzeichen der Erkrankung ist eine chronisch fortschreitende Degeneration der Arterien mit progressiven Veränderungen der Gefäßwand. Durch Bindegewebewucherung, intra- und extrazelluläre Einlagerungen von Cholesterin, Fettsäuren und Kalk sowie durch die Akkumulation von Kollagen und Proteoglykanen kommt es zu einer Verhärtung und Verdickung der Gefäße, die mit Verengungen und einer abnehmenden Elastizität einhergeht.

Insgesamt wird die Atherosklerose heutzutage als eine Erkrankung verstanden, deren Entstehung in der fortwährenden Reaktion des Gefäßes auf einen anhaltenden Reiz begründet liegt. Ausschlaggebende Risikofaktoren hierfür sind Hyperlipidämie, Diabetes, Bluthochdruck und Rauchen. Diese führen zur Dysfunktion oder zur Schädigung des Endothels, zur Thrombozytenaktivierung und Thrombusbildung, zur chronischen Entzündungsreaktion mit Einwanderung von Leukozyten und zur Aktivierung und Proliferation glatter Gefäßmuskelzellen. Multiple Wachstumsfaktoren und Zytokine werden von den geschädigten Endothelzellen, Entzündungszellen, Thrombozyten und glatten Gefäßmuskelzellen freigesetzt und vermitteln die Chemoattraktion, Migration, Proliferation, Apoptose und Matrix-Modulation der Zellen.⁶

Das Konzept der Pathophysiologie der Atherosklerose und restenotischer Prozesse hat sich in den letzten Jahren grundlegend verändert und die neuen Erkenntnisse bieten uns neue Perspektiven für präventive und therapeutische Strategien: Neuere Studien haben die vorrangige Bedeutung inflammatorischer Prozesse bei der Entstehung der Atherosklerose von frühen Läsionen bei Jugendlichen, über die vulnerable Plaque bis hin zu thrombotischen Komplikationen aufzeigen können.^{7, 8} Leukozyten adhären, wandern entlang eines chemotaktischen Gradienten in das Gewebe ein und kumulieren in den entstehenden atherosklerotischen Läsionen. Zusammen mit den Zellen der

Gefäßwand sezernieren sie Zytokine und Wachstumsfaktoren, die die Migration und Proliferation glatter Gefäßmuskelzellen (VSMC) und die Synthese extrazellulärer Matrixproteine induzieren.

Zusätzlich zur Inflammation stellt die Zellvermehrung (Proliferation) einen Schlüsselprozess sowohl bei der Entstehung der Atherosklerose als auch restenotischer Prozesse dar.^{6, 9-11} Man geht von der Vorstellung aus, dass eine fokale Akkumulation glatter Gefäßmuskelzellen in der Intima, welche sich beim Menschen bereits im Kindesalter entwickelt und im Alter verdickt, der Entstehung einer atherosklerotischen Läsion vorausgeht.^{10, 12}

Über die Herkunft dieser Zellen gibt es unterschiedliche Theorien: Der Gedanke liegt nahe, dass die Zellen der entstehenden Neointima aus residenten glatten Gefäßmuskelzellen der Intima hervorgehen. Es konnte jedoch gezeigt werden, dass auch eine Migration glatter Gefäßmuskelzellen aus der Media über die Lamina elastica interna oder sogar aus der Adventitia über die Media in die entstehende Neointima stattfindet.¹³ Weiterhin konnte gezeigt werden, dass embryonale Endothelzellen die Fähigkeit besitzen, zu mesenchymalen Zellen zu transdifferenzieren und ‚smooth muscle cell actin‘ zu exprimieren, was eine Herkunft der neointimalen glatten Gefäßmuskelzellen von Endothelzellen denkbar erscheinen lässt.¹⁴ In Tiermodellen der Hyperlipidämie-induzierten Atherosklerose, der Restenose nach Angioplastie und der Transplantatvaskulopathie konnte kürzlich gezeigt werden, dass neointimale glatte Gefäßmuskelzellen ihren Ursprung evtl. sogar in aus dem Knochenmark stammenden Progenitorzellen oder anderen zirkulierenden Zellpools haben könnten.¹⁵⁻¹⁸ Ob Knochenmarkzellen auch beim Menschen an der Entstehung neointimalen Gewebes beteiligt sind, ist bisher unklar. Kürzlich konnten jedoch zirkulierende Glattmuskelzell-Progenitorzellen in humanem peripheren Blut identifiziert werden.¹⁹

Ungeachtet ihren Ursprungs sind diese Zellen maßgeblich an der Entwicklung der intimalen Hyperplasie und der Entstehung der fibrösen Deckkappe (‚fibrous cap‘) der atherosklerotischen Läsionen beteiligt. Die Beschaffenheit dieser intimalen Hyperplasie ist jedoch in den verschiedenen Stadien der Atherosklerose sehr unterschiedlich: In frühen, fettreichen Läsionen ist die fibröse Kappe dünn und es zeigt sich eine erhöhte Apoptoserate der glatten Gefäßmuskelzellen vor allem an den ‚Schultern‘, d.h. an den seitlichen

Begrenzungen der atherosklerotischen Plaques.²⁰ Des Weiteren hemmt das lokale inflammatorische Milieu die Kollagensynthese, induziert die Expression von Kollagenasen und hemmt die Expression proteolytischer Inhibitoren. Dies dünnt die fibröse Deckplatte noch weiter aus und kann letztendlich zur Ruptur der Plaque, zur Freisetzung des thrombogenen Materials und zum thrombotischen Lumenverschluss des Gefäßes führen.^{8, 10}

In weiter fortgeschrittenen Läsionen formen Fibroblasten zusammen mit glatten Gefäßmuskelzellen und extrazellulären Kalzifikationen eine stabile, fibrokalzifizierte Läsion (Abb.1).

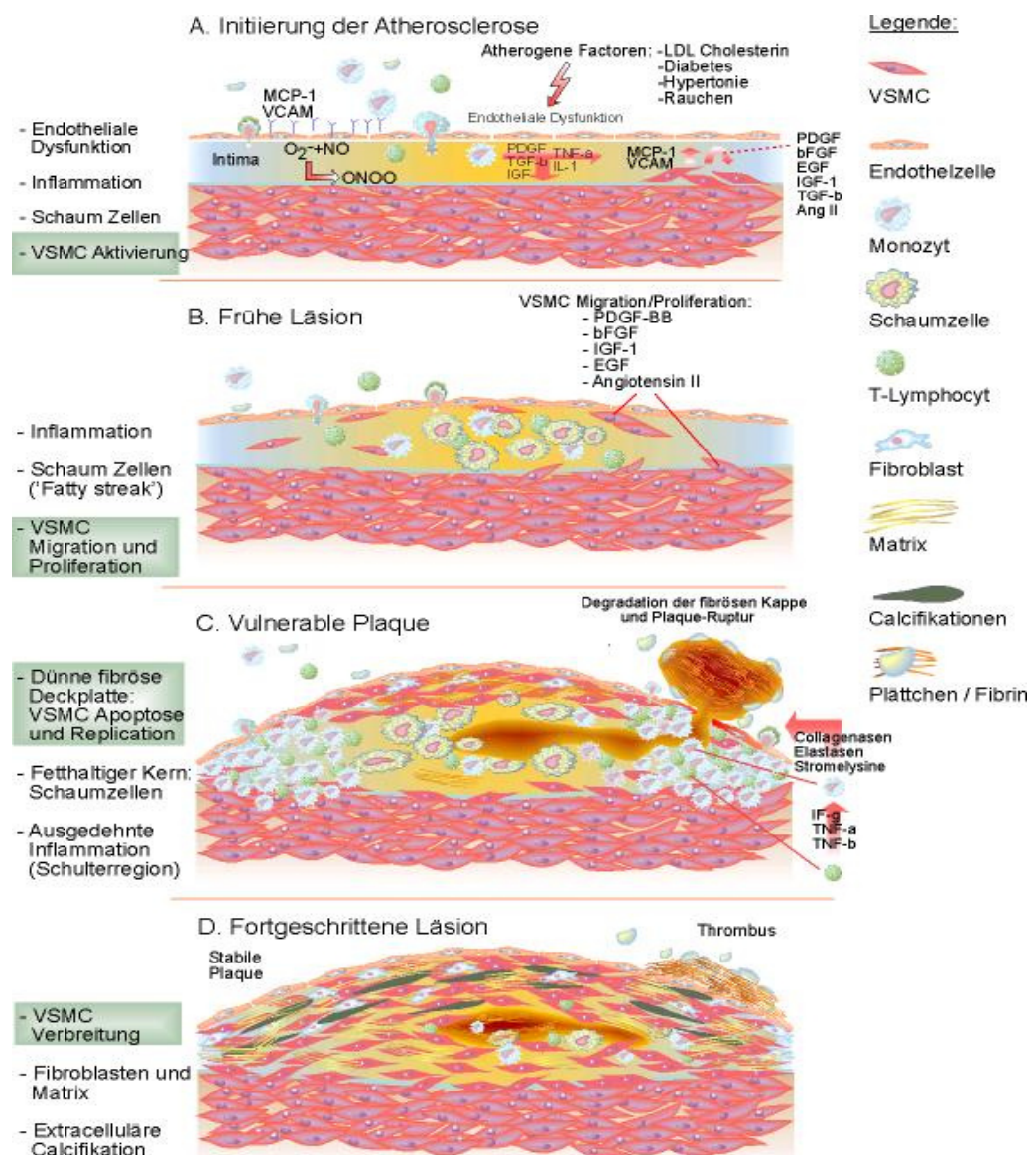


Abb. 1: Übersicht über den zeitlichen Verlauf der Entstehung atherosklerotischer Läsionen (D. Sedding)

1.2 Remodeling

Bis zu einem gewissen Grad besitzen Gefäße die Fähigkeit, ihre Struktur den geänderten Verhältnissen anzupassen. So kann der Durchmesser des Gefäßlumens bei gleichzeitiger Vergrößerung der Gefäßwand trotz der Akkumulation von atherosklerotischem oder neointimalem Gewebe zunächst unverändert bleiben.²¹ Mit Progression der Atherosklerose hängt der Durchmesser des Gefäßlumens ab von der Balance zwischen Faktoren, die eine Vergrößerung des Lumens (positives Remodeling) bewirken, und Faktoren, die, getriggert durch die entzündliche Gefäßantwort, eine zunehmende Neointima-Bildung und Stenosierung des Gefäßes (negatives Remodeling) bewirken.²² Hauptverantwortlich für die neointimale Stenosierung der Gefäße ist eine Aktivierung und ein Wiedereintritt glatter Gefäßmuskelzellen in den Zellzyklus mit nachfolgend resultierender Proliferation.

1.3 Grundlagen der Restenose

Die Restenose ist der Heilungsprozess der Gefäßwand nach mechanischer Verletzung und beinhaltet zwei Schlüsselprozesse: Neointimale Hyperplasie (SMC Migration/Proliferation, extrazelluläre Matrixablagerung) und Gefäßwandremodeling. Forrester et al.²³ unterteilten 1991 den Prozess der Restenose erstmals in drei Phasen: eine inflammatorische, eine Granulations- oder Zellproliferationsphase und eine Remodelingphase.

Restenosen treten immer noch häufig nach invasiv-revaskularisierende Maßnahmen in Folge von Ballon Dilatation oder Stenting in den betroffenen Gefäßen auf (Abb. 2).

Ausgelöst durch die erfolgte Dilatation kommt es zu einer Deendothelialisierung, Aufplatzen des Plaques (häufig mit Dissektion der Tunica Media und seltener der Adventitia) und zu einer Überdehnung des Gefäßes (Abb. 2B). Daraufhin lagern sich Thrombozyten und Fibrin an der Verletzungsstelle ab. Die aktivierten Thrombozyten exprimieren Adhäsionsmoleküle wie P-Selektin, die wiederum Leukozyten aus der Zirkulation binden und einen als „Rolling“ betitelten Prozess einleiten, bei dem Entzündungszellen an die verletzte Gefäßwand adherieren und entlang eines von SMCs und residenten Makrophagen produzierten chemotaktischen

Gradienten in das verletzte Gewebe einwandern. Es folgt eine Granulations- oder Zellproliferationsphase. SMCs, Leukozyten und Thrombozyten sezernieren Wachstumsfaktoren, welche die Migration von SMCs von der Media in die Neointima anregen (Abb. 2C). Die sich bildende Neointima besteht aus stark proliferierenden SMCs, extrazellulärer Matrix und rekrutierten Makrophagen (Abb. 2D).

Im Langzeitverlauf über Wochen und Monate folgt nun eine Remodeling-Phase, in der hauptsächlich extrazelluläre Matrixproteine degradiert und resynthetisiert werden. Zugleich nimmt der zelluläre Anteil der Neointima ab zugunsten der extrazellulären Matrix, die sich aus verschiedenen Kollagenen und Proteoglykanen²⁴ zusammen setzt, und zur Hauptkomponente des restenotischen Plaques wird.²⁵

In Ballon-angioplastierten Gefäßen kann diese Neuorganisation der extrazellulären Matrix durch den Austausch von hydrierten Molekülen durch Kollagen zu einem negativen Remodeling führen.²⁶ Nach Stent-Implantation besitzt diese letzte Phase weniger Einfluss, da trotz der geförderten SMC Migration weniger negatives Remodeling durch bestimmte Bestandteile der extrazellulären Matrix (Hyaluron, Fibronectin, Osteopontin und Vitonectin) auftritt.^{27, 28} In jedem Fall kommt es jedoch zu einer Reendothelialisierung der verletzten Gefäße.

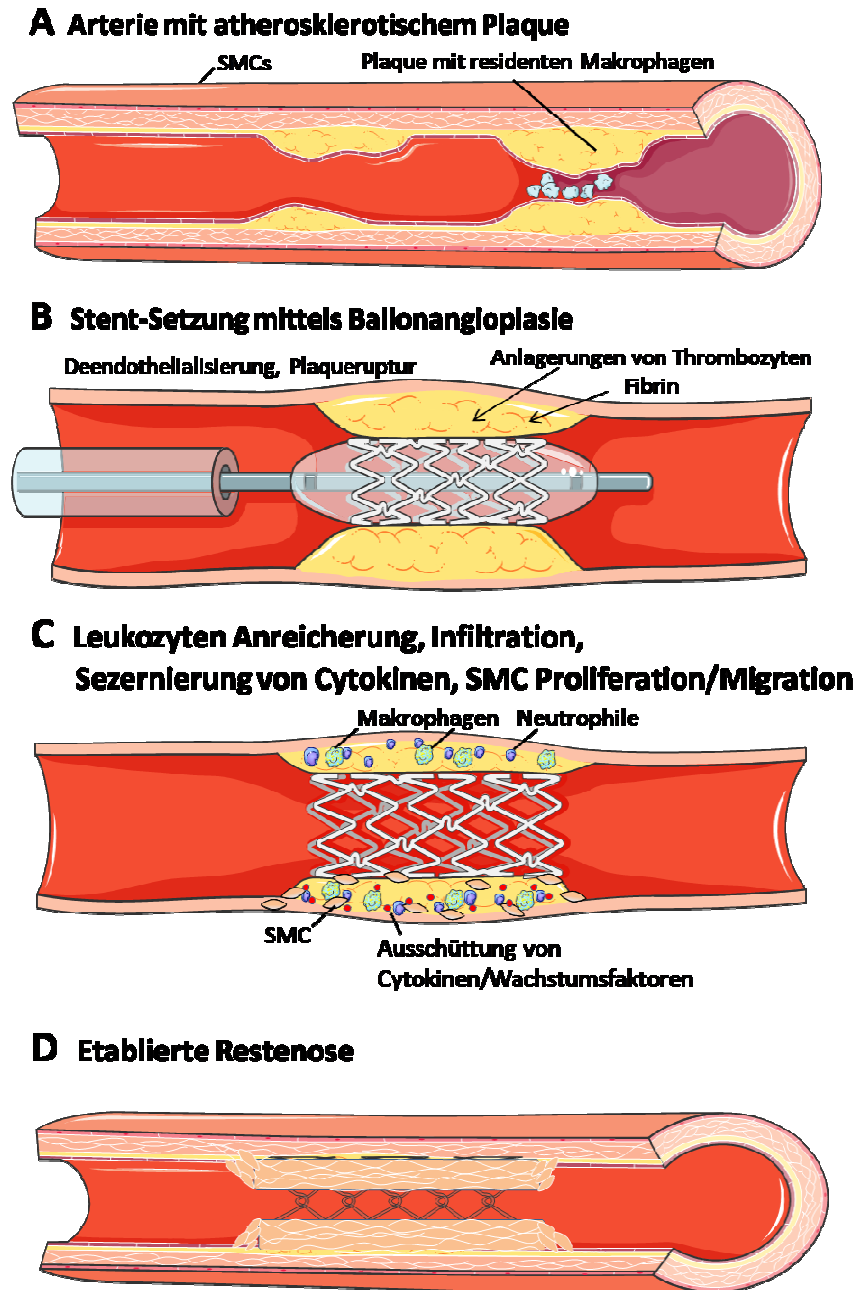


Abb. 2: Übersicht über den zeitlichen Verlauf der Restenose

1.4 Therapie vaskuloproliferativer Erkrankungen

Eine Vielzahl von Ansätzen wurde bisher untersucht, um die Proliferation glatter Gefäßmuskelzellen zu hemmen. Zahlreiche pharmakologische Inhibitoren wie Thrombozytenaggregationshemmer, Antikoagulantien, ACE-Hemmer oder weitere zytotoxische Agentien brachten jedoch nicht den erhofften Erfolg. Das Versagen der erfolgversprechenden Therapieansätze in klinischen Studien mag an den Unterschieden der Spezies oder an einer

falschen Dosierung der untersuchten Substanzen liegen. Es zeigt sich darin jedoch auch eindrucklich, dass die multifaktoriellen und redundanten Prozesse, die zur Entstehung der Atherosklerose oder Restenose führen, durch die Hemmung einzelner Faktoren nur unzulänglich zu beeinflussen sind. Der Fokus des Interesses bei der Entwicklung antiproliferativer Strategien hat sich daher in letzter Zeit auf den Zellzyklus als gemeinsame Endstrecke der multiplen proliferativen Stimuli gerichtet. Strategien zur Beeinflussung des Zellzyklus beinhalten die Strahlentherapie, pharmakologische Substanzen und gentherapeutische Ansätze:

In den 90iger Jahren gab es einige Studien, die die Wirksamkeit strahlentherapeutische Ansätze aufzeigten.²⁹⁻³¹ Unvorhersehbare Nebenwirkungen wie eine späte In-Stent-Thrombose oder die Ausbildung proximaler oder distaler Stenosen („candy wrapper effect“) wirkten diesen Vorteilen aber entgegen. Mittlerweile wurde der Strahlentherapeutische Ansatz von der Möglichkeit Stents mit antiproliferativen Wirkstoffen zu beschichten abgelöst.

Neben einer großen Anzahl vielversprechender Substanzen wie Paclitaxel (Taxol),³² Flavopiridol³³ oder CVT-313³⁴ ist das Makrolid-Antibiotikum Rapamycin eine der derzeit vielversprechendsten Substanzen: In der ‚RAVEL‘ Studie konnte durch mit Sirolimus beschichtete Stents ein Jahr nach Implantation eine Restenoserate von 0% im Gegensatz zu 26% in der Patientengruppe mit unbeschichteten Stents erzielt werden.³⁵ Und auch aktuellere Studien zeigen einen klaren Vorteil von beschichteten Stents (DES, drug eluting stents) im Vergleich zu unbeschichteten (BMS, bare metal stents) auf. So besteht für Patienten mit beschichteten Stents zwei Jahre nach Behandlung ein signifikant geringeres Mortalitätsrisiko, eine niedrigere Herzinfarktrate und und seltenere Revaskularisierung des betroffenen Gefäßes. Die Langzeit-Restenoserate liegt hier bei 7%-14%.³⁶ Die potente anti-proliferative Wirkung dieser Substanzen wirkt sich jedoch nicht nur auf die glatten Gefäßmuskelzellen aus sondern hemmt auch die Reendothelialisierung des verletzten Gefäßes, so dass es bei unzureichender Antikoagulation vermehrt zu gefährlichen in-Stent-Thrombosen kommt. Zukünftige, optimierte Therapiestrategien sollten neben ihrem potenten anti-proliferativen Effekt auf

glatte Gefäßmuskelzellen also wenig Einfluss auf die Funktion von Endothelzellen haben.

Gentherapeutische Ansätze reichen von ‚antisense‘-Oligodesoxynukleotiden (AS-ODN) über Transkriptionsfaktor-, ‚decoy‘-Konstrukte bis hin zur Überexprimierung proliferationshemmender Gene, um einen zytostatischen Effekt in den Zellen zu erzielen. In den ersten veröffentlichten Gentherapiestudien zur Reduktion der Restenose konnte gezeigt werden, dass ‚decoy‘-ODN gegen das Zellzyklusprotein E2F die Neointimabildung in peripheren und koronaren Bypässen signifikant verringern kann.^{5, 37}

Die Zellzyklushemmung, ob auf strahlentherapeutischer, pharmakologischer oder gentherapeutischer Ebene, stellt somit den bislang effektivsten und erfolgversprechendsten Ansatz zur Verhinderung multifaktoriell bedingter vaskuloproliferativer Erkrankungen dar.

1.5 MicroRNA

MicroRNAs (miRNAs) sind endogene, nichtkodierende, einzelsträngige RNA-Moleküle, von einer Größe von nur 17-28 Nukleotiden, die eine erst kürzlich entdeckte Klasse von Genregulatoren darstellen.³⁸

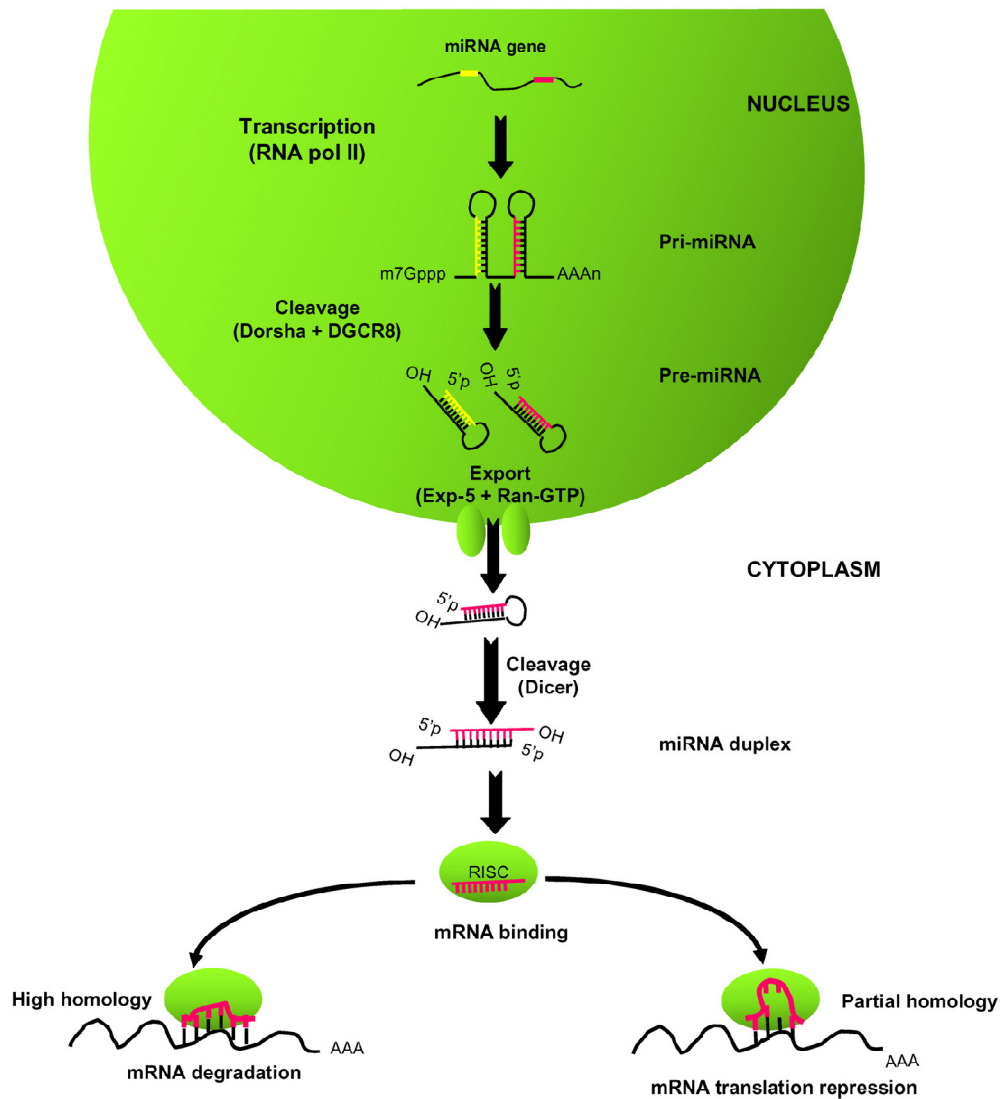
Ihre Zahl wird beim Menschen auf über 1000 geschätzt, wobei jede miRNA wiederum hunderte von mRNAs regulieren kann. Zusammengenommen wird geschätzt, dass miRNAs etwa ein Drittel des menschlichen Genoms regulieren.³⁹ Ihre wichtige Rolle wurde in vielen biologischen Prozessen bereits bestätigt, wie z.B. Embryonalentwicklung, Zelldifferenzierung, Proliferation, Apoptose, Onkogenese, Inlusin Sekretion und Cholesterolsynthese.⁴⁰⁻⁴⁴

1.6 miRNAs, Synthese und Funktion

MiRNAs sind häufig im Genom in Clustern von mehreren miRNAs organisiert, die gemeinsam abgelesen werden. Die Mehrheit (70%) ist in Introns oder Exons von Genen lokalisiert, mit denen sie gemeinsam transkribiert werden. 30% liegen zwischen kodierenden Bereichen.⁴⁵

In der Regel werden miRNAs von der RNA polymerase II transkribiert⁴⁶ und diese entstehenden primären miRNAs (pri-miRNA) werden polyadenyliert und erhalten ein 5'-methylguanosin Cap.⁴⁷ Ihre Größe variiert zwischen 200 Nukleotiden und mehreren Kilobasen. Noch im Zellkern wird die pri-miRNA von der RNase Drosha in die Vorläufer-miRNA (pre-miRNA) gespalten.⁴⁷ Pre-miRNAs besitzen eine charakteristische Hairpin-Struktur und haben noch eine Länge von etwa 70 Nukleotiden. Sie enden 5' mit einem Monophosphat und haben 3' einen Überhang von 3 Nukleotiden.⁴⁷⁻⁴⁹ Die korrekt gesplattene pre-miRNA wird von Exportin-5 und seinem Cofaktor Ran-GTP erkannt, am 3'-Überhang und angrenzenden Bereich gebunden^{50, 51} und aus dem Kern transportiert.^{52, 53} Im Zytosol wird das GTP hydrolysiert, was zur Freisetzung der pre-miRNA führt, die nun wiederum von dem Enzym Dicer weiter prozessiert wird.⁵³ TRBP (Transactivating Region Binding Protein)⁵⁴ und PACT (interferon-inducible double strand-RNA-dependent Protein Kinase Activator)⁵⁵ sind Cofaktoren von Dicer. Zusammen binden diese Enzyme an den 3' Überhang der pre-miRNA und Dicer spaltet den terminalen Loop, so dass ein etwa 21 Nukleotide großes, noch doppelsträngiges Zwischenprodukt entsteht. Der Strang, dessen 5'-Ende energetisch weniger stabil ist wird in RISC (RNA Induced Silencing Complex) inkorporiert,⁵⁶ während der andere Strang freigesetzt und degradiert wird.^{57, 58} Die Zusammensetzung von RISC ist noch nicht vollständig aufgeklärt, doch die Argonaut-Proteinfamilie bildet einen wichtigen Bestandteil.^{57, 59}

Die mature miRNA leitet den RISC zur komplementären mRNA, bindet sie über Watson-Crick Basenpaarung und führt nun abhängig vom Grad der Komplementarität zur Degradation der mRNA oder zur Inhibierung der Translation. In eukaryotischen Zellen liegt in der Regel eine imperfekte Komplementarität vor, was zur inhibierten Translation und somit reduzierten Expression des betreffenden Proteins führt.^{60, 61}

Abb. 3: Übersicht über die Synthese und Funktion von miRNAs⁶²

1.7 Dicer und Drosha im Kardiovaskulären System

Dicer und Drosha sind zwei essentielle Enzyme für die miRNA Synthese.

Sie gehören zur RNase III Familie und spalten miRNAs in ihre aktive Form.

Ein Knockout von Dicer in Mäusen zeigte, dass Dicer auch für die Entwicklung essentiell ist, der Knockout erwies sich als letal.⁶³ Während der Embryogenese ist Dicer notwendig für die Skelettmuskelentwicklung,⁶⁴ aber neuere Publikationen weisen auch auf eine wichtige Rolle im Kardiovaskulären System hin. So resultierte ein herzspezifischer Knockout in kardialen Vorläuferzellen an Tag E8,5 in einer tödlichen Herzinsuffizienz nur 4 Tage später.⁶⁵ Ein postnataler herzspezifischer Knockout führte zu einer

dilatativen Kardiomyopathie, ⁶⁶ was die wichtige Rolle Dicers für die Entwicklung und Funktion des Herzens unterstreicht.

Dazu scheint Dicer auch auf die Angiogenese einen entscheidenden Einfluss zu haben. Während der Embryonalentwicklung zeigen dicerdefiziente Mäuse eine beeinträchtigte Gefäßentstehung,⁶⁷ dementsprechend führte ein Dicer Knockout im Zebrafisch zur Ausbildung eines unterbrochenen Blutkreislaufes.⁶⁸

In Endothelzellen (ECs) wird Dicer konstitutiv exprimiert. Ein Knockdown via siRNA führte zu verringerter Proliferation,^{69, 70} Migration und Matrigel Tube Formation.⁷¹ Genexpressionsanalysen zeigten, dass *in vitro* und *in vivo* zahlreiche Gene reguliert sind, die in der Angiogenese eine Rolle spielen wie VEGF (Vascular Endothelial Growth Factor) und sein Rezeptor Flt1.^{69, 70}

Im Gegensatz zu Dicer ist bisher wenig über die biologische Rolle von Drosha bekannt. *In vitro* Experimente konnten bisher zeigen, dass ein Knockout in HeLa-Zellen zu einer Akkumulation von pri-miRNAs und einer Reduktion von pre-miRNA und muren miRNAs führte, was die bisher bekannte Funktion während der miRNA-Synthese bestätigt.⁴⁹

In Endothelzellen hatte ein Knockout von Drosha *in vitro* wenig Effekt auf Zellfunktion und Angiogenese. Gefäßsprossung und Tube-Formation waren zwar beeinträchtigt, doch *in vivo* konnten im Matrigelplug Modell keine Effekte detektiert werden.⁷⁰

1.8 miRNAs in vaskulären Erkrankungen

Während miRNAs vor einigen Jahren noch die Rolle des „Fine Tunings“ der Genexpression zugesprochen wurde, zeigen heutige Publikationen wichtige Schlüsselrollen für einzelne oder auch Cluster von miRNAs in fast allen physiologischen und pathophysiologischen Prozessen auf.

Eine interessante Eigenschaft von etwa einem Drittel aller miRNAs ist zudem, dass ihre Expression spezifisch für das jeweilige Gewebe oder den Zelltyp ist.⁷² Über die Rolle von miRNAs in vaskulären Erkrankungen und Zellen ist bisher noch sehr wenig bekannt.

Doch zeigen die deutlichen Effekte, die nach einem Knockdown von Dicer auftreten, eine entscheidende Rolle der miRNAs im Kardiovaskulären System

auf. Dementsprechend finden sich bei kardialen Erkrankungen, wie beispielsweise der kardialen Hypertrophie, dem Myokardinfarkt oder der Herzinsuffizienz, spezifische Deregulationen der miRNA Expression.^{65, 73, 74} Verschiebungen des kardialen miRNA-Expressionsprofils sind allerdings nicht bei allen kardialen Pathologien gleich. Eine genomweite miRNA-Expressions-Studie an humanen Myokardproben aus Patienten mit Aortenstenose, dilatativer Kardiomyopathie und ischämischer Kardiomyopathie konnte zeigen, dass einzelne MicroRNAs spezifisch bei bestimmten kardialen Erkrankungen reguliert werden.⁷⁵ Diese Deregulation einzelner miRNAs scheint zum Teil reversibel zu sein, so normalisierte sich eine Subgruppe von miRNAs im herzinsuffizienten Myokard nach Einbau linksventrikulärer Unterstützungssysteme.⁷⁶ Die unterschiedliche Expression und Aktivierung von miRNAs wird wahrscheinlich über Transkriptionsfaktoren und das miRNA-produzierende Enzym Dicer mit reguliert.^{66, 77}

In der Ratte wurde 2007 zum ersten Mal gezeigt, dass miRNAs in der Gefäßwand nach Ballonangioplastie reguliert werden.⁷⁸ Besonders auffällig war die stark verringerte Expression von miR-125a, 125b, 133a, 143, 145, 347 und 365, während miR-21, 145, 214 und 352 deutlich hochreguliert waren.

Mir-21 zeigte des Weiteren *in vitro* einen pro-proliferativen und anti-apoptotischen Effekt in SMCs von Ratten, der auf einer beeinflussten Expression von PTEN und Bcl-2 zu beruhen scheint. *In vivo* reichte ein Knockdown von miR-21 aus, um die Neointimaentwicklung nach Angioplastie signifikant zu verringern, was die Bedeutung selbst einzelner miRNAs in biologischen Prozessen unterstreicht.

Dass miRNAs auch die vaskuläre Inflammation regulieren können publizierten Harris et al. 2007.⁷⁹ Sie konnten zeigen, dass miR-126 in ECs die Expression von VCAM-1 (Vascular Cell Adhesion Molecule 1) hemmt. VCAM-1 wird von in der Gefäßwand ruhenden ECs normalerweise nicht exprimiert. Nach Cytokin induzierter Aktivierung wird VCAM-1 synthetisiert, um Leukozyten an Orte der Inflammation zu dirigieren. *In vitro* Experimente konnten bestätigen, dass eine durch miR-126 Knockdown vermittelte VCAM-1 Expression dosisabhängig zu einer verstärkten Adhesion von Leukozyten

fürte. Somit könnte diese miRNA einen therapeutischen Ansatz zur Kontrolle vaskulärer Inflammation aufzeigen.

Dass durch Untersuchungen der Wirkungsweisen von miRNAs auch die Pathomechanismen bekannter Krankheitsbilder erklärt werden können zeigt das Beispiel von miR-155.

Der +1166A/C Polymorphismus im humanen AT₁R (Angiotensin II Type 1 Receptor) Gen führt zu Kardiovaskulären Erkrankungen. Da der Polymorphismus im nicht kodierenden Bereich der 3'UTR liegt, war der Grund für dieses Phänomen bisher ungeklärt. Martin et al.⁸⁰ konnten nun zeigen, dass miR-155 an die mRNA des AT₁R bindet und so die Translation inhibiert. Liegt aber der Polymorphismus vor, der in der Bindungsregion der miRNA lokalisiert ist, ist diese Bindung von miRNA an die mRNA unterbunden und der Rezeptor wird verstärkt exprimiert, was zur Ausbildung von z.B. kardialer Hypertrophie führt.

Zusammengefasst konnte bisher gezeigt werden, dass miRNAs auch in vaskulären Erkrankungen eine wichtige Rolle spielen können, wobei erst wenige Zusammenhänge aufgeklärt werden konnten. Ein großes Ziel für die Zukunft wird sein, die funktionelle Bedeutung einzelner miRNAs und ihre Rolle in unterschiedlichen Pathologien weiter zu evaluieren.

2. Fragestellung

In der vorliegenden Arbeit sollte untersucht werden, welchen Einfluss miRNAs auf die Entwicklung der Atherosklerose und Restenose haben.

Da über die Expression von miRNAs in vaskuloproliferativen Erkrankungen zu Beginn dieser Arbeit noch keinerlei Erkenntnisse vorlagen, sollten zunächst die Expressionsprofile von miRNAs während der Atherosklerose und Restenose im Mausmodell untersucht werden. Darauf aufbauend sollten die Expressionsunterschiede den bei diesen Erkrankungen vorherrschenden Zelltypen, den glatten Gefäßmuskelzellen, Endothelzellen und Monozyten/Makrophagen zugeordnet werden. Die regulierten miRNAs sollten auf ihre funktionelle Bedeutung hin weiter charakterisiert und in die molekularen Mechanismen spezifischer Zellfunktionen eingeordnet werden.

Ein weiterer Schwerpunkt sollte auf der Untersuchung der beiden essentiellen Enzyme für die miRNA-Synthese, Dicer und Drosha, liegen.

Ihre Expression, Regulation und funktionelle Bedeutung während der Entstehung der Restenose und Atherosklerose sollte sowohl *in vivo* als auch *in vitro* analysiert werden.

3. Material und Methoden

3.1 Geräte

Adobe Photoshop 4.0 LE	ADOBE SYSTEMS INC., San Jose, USA
Akku Pipettierhilfe	HIRSCHMANN, Eberstadt
Biofuge Fresco	HERAEUS INSTRUMENTS, Hanau
Blockthermostat 1302	HAEP LABOR CONSULT, Bovenden
Combitips	EPPENDORF, Hamburg
Elektrophoresekammer	BIO-RAD, München
FACS cell sorter EPICs Altra	BECKMAN COULTER, Miami, USA
Feinwaage	SARTORIUS, Göttingen
Grobwaage	SARTORIUS, Göttingen
Hyperfilm ECL	AMERSHAM PHARMACIA, Braunschweig
iBlot	INVITROGEN, Carlsbad, CA-USA
Inkubator 1000	HEIDOLPH, Kehlheim
Magnetrührer Ikamag	IKA LABORTECHNIK, Staufen
Mikrotiterplatte	GREINER, Frickenhausen
MxPro 3000 qPCR	STRATAGENE, Cedar Creek, TX-USA
OP-Besteck	Aesculap AG & Co. KG, Tuttlingen FST, Foster City, CA-USA
Photometer SLT Spectra	SLT LABINSTRUMENTS, Crailsheim
Pipetten	GILSON, Viliers-le-Bel, Frankreich
Pipettenspitzen	GILSON, Viliers-le-Bel, Frankreich
Polypropylen Röhrchen 15ml/50ml	GREINER, Frickenhausen
Reaktionsgefäße 0,5/1,5/2ml	EPPENDORF, Hamburg
Röntgenkassette	AMERSHAM PHARMACIA, Braunschweig
Scanner (Scan Maker III)	MICROTEK, Ratingen
Schüttler Duomax 1030	HEIDOLPH, Kehlheim
Sterile Zellkultur-Arbeitsbank	HERAEUS INSTRUMENTS, Hanau

3.2 Chemikalien, Reagenzien und Medien

Agarose	SIGMA, Steinheim
Aqua dest.	BRAUN, Melsungen
BSA (Bovines Serum Albumin)	BIO-RAD, München
Dulbecco's 1x PBS	PAA LABOR. Linz, Österreich
DTT (Dithiothreitol)	SIGMA, Steinheim
ECL Plus (Western blotting detection reagent)	AMERSHAM PHARMACIA, Braunschweig
Ethanol	RIEDEL-DE HAEN, Seelze
EZ Load Molecular Ruler	BIO-RAD, München
Glycerol	SIGMA, Steinheim
Glycin	ROTH, Karlsruhe
HCl 37,3% (rauchend)	SIGMA, Steinheim
<i>in vivo</i> Jet PEI	POLYPLUS TRANSFECTION, Illkirch Cedex, Frankreich
Isopropanol	MERCK, Darmstadt
Leupeptin	SIGMA, Steinheim
Methanol	RIEDEL DE HAEN, Seelze
2-Mercaptomethanol	SIGMA, Steinheim
Milchpulver	BIO-RAD, München
NaCl	ROTH, Karlsruhe
0,9 % isotonische NaCl-Lösung	DIACO, Trieste, Italien
NP40 (Igepal Ca-630)	SIGMA, Steinheim
Nucleic Acid Sample Loading Buffer	BIO-RAD, München
NuPage 4-12% Bis-Tris-Gele	INVITROGEN, Karlsruhe
NuPage Sample Reducing Agent	INVITROGEN, Karlsruhe
Oxalic acid	SIGMA, Steinheim
Protein Assay (A,B,C)	BIO-RAD, München
Trizma Base	SIGMA, Steinheim
Tween 20 (Polyoxyethylenesorbitan Monolaureat)	SIGMA, Steinheim

3.3 Medikamente und Narkotika

Isofluran-Baxter	BAXTER Deutschland GmbH, Unterschleißheim
Rompun 2 %	BAYER VITAL GmbH, Leverkusen
Ketamin Incresa 50mg/ml	INCRESA ARZNEIMITTEL GmbH, Freiburg
Atropinsulfat 0,5 mg/ml	FRESENIUS KABI, Bad Homburg
Xylocain 2%	ASTRA ZENECA GmbH, Wedel

3.4 Substanzen

<i>Substanz</i>	<i>Wirkung</i>	<i>Hersteller</i>
PDGF-BB (rec. hum.)	pro-proliferative	R&D Systems, Minneapolis, MN-USA
IGF-1 (rec. hum.)	pro-proliferative	Biomol, Hamburg
FGF-2 (rec. hum.)	pro-proliferative	Biomol, Hamburg
INF- γ (rec. hum.)	pro-inflammatorisch	Biomol, Hamburg
TNF- α (rec. hum.)	pro-inflammatorisch	Biomol, Hamburg
IL-1 β (rec. hum.)	pro-inflammatorisch	Thermo Scientific, Rockford, IL-USA
Ly294002	PI3K Inhibitor	Calbiochem, Darmstadt
Wortmannin	PI3K Inhibitor	Calbiochem, Darmstadt

3.5 Zellkultur

Glatte Gefäßmuskelzellen (SMC), sowie Endothelzellen (EC) aus humanen Koronararterien wurden von der Firma Lonza (Basel, Schweiz) bezogen. Die Kultivierung der Zellen erfolgte in Smooth Muscle Cell Growth Medium oder Basal Medium (provitro, Berlin) bzw. EBM-2 mit und ohne Zusätze (clonetics, Walkersville, MD-USA).

Es wurden ausschließlich Zellen der Passagen 3-6 bei SMCs bzw. 2-5 bei ECs verwendet. Alle Arbeiten mit Zellen wurden an der sterilen Zellkultur-Arbeitsbank und mit sterilen Materialien und Lösungen durchgeführt.

3.6 Isolation von Monozyten/Makrophagen aus Blut

Für die Isolation von Monozyten/Makrophagen aus humanem Blut wurden 15 ml Blut in heparinisierten Blutentnahmeküvetten entnommen. Zuerst wurde nun die mononukleären Zellen isoliert. Hierfür wurden 15 ml Blut mit 15 ml PBS mit 2 % FCS vermischt und auf 15 ml Ficoll in einem 50 ml Greiner-Röhrchen geschichtet. Das Gemisch wurde 30 min bei 400 x g zentrifugiert. Die weiße Phase (buffycoat) wurde vorsichtig mit einer sterilen Pasteurpipette abgenommen und in ein 15 ml Greiner-Röhrchen mit 5 ml vorgelegtem PBS (mit 2% FCS und 1 mM EDTA) überführt. Die Zellen wurden nun durch eine Zentrifugation für 10 min bei 120 x g pelletiert, zum Waschen in 5 ml PBS resuspendiert und erneut abzentrifugiert (10 min bei 120 x g). Dann wurde das Pellet in 2 ml PBS (mit 2% FCS und 1 mM EDTA) resuspendiert und die Zellen gezählt. Für die Monocyten-Isolation mit dem EasySep – „negative depletion Kit“ der Firma Stemcell können max. 2 ml (max. 10^8 Zellen, max. Konz.: 5×10^7 Zellen/ml) eingesetzt werden.

Eine entsprechende Menge der mononukleären Zellsuspension wurde in ein 5 ml polystyrene Röhrchen überführt und 50 µl/ml des „Human Monocyte Enrichment Cocktails without CD16 depletion“ zugegeben. Die Reaktion wurde gut vermischt und bei 4°C für 10 min inkubiert. Nun wurden die D Magnetic Particles für 30 sek gevortext bis sie eine uniforme Suspension bildeten. Die magnetischen Partikel wurden zu den Zellen im Verhältnis 50µl/ml pipettiert, gut vermischt und bei 4°C für 5 min inkubiert. Das Volumen der Zellsuspension wurde nun auf 2,5 ml mit PBS/FCS/EDTA aufgefüllt und durch vorsichtiges auf- und abpipettieren mit den Zellen vermischt. Das Röhrchen wurde nun in den Magneten gestellt und 2,5 min bei Raumtemperatur inkubiert. Danach wurde der Magnet aufgenommen und in einer flüssigen Bewegung Magnet samt Röhrchen invertiert und der Inhalt in ein neues 5 ml Röhrchen gegossen. Zellen, die keine Monocyten oder Makrophagen sind sollten jetzt an die Magnetic Particles gebunden bleiben, und somit im alten Röhrchen verbleiben.

3.7 Proteomics

3.7.1 Protein Isolation

RIPA Puffer:

1 x PBS ohne Calcium und Magnesium

1% NP 40

0,5% Natriumdeoxycholat

0,1% SDS

ad 500ml H₂O, Lagerung bei +4° C

Proteaseinhibitoren

Protease Inhibitoren Cocktail Tabletten (Roche, Basel, Schweiz)

Die Zellen wurden in 6 oder 10 cm Schalen kultiviert. Zur Proteinisolation wurde das Medium von den Zellen abgesaugt und diese 3 x mit eiskaltem PBS gewaschen. Je nach Schalengröße wurden 40 µl RIPA inkl. Proteaseinhibitoren zu 6 cm Schalen oder 100 µl zu 10 cm Schalen gegeben und die Zellen mit einem Zellschaber gelöst. Nach Überführung in Eppendorfhütchen wurde die Zellsuspension 15 min auf Eis inkubiert, dann 15 min bei 4°C und 1300 x g zentrifugiert. Der Überstand enthielt die gelösten Proteine und wurde in neue Eppendorfhütchen überführt. Die Lagerung erfolgte bei -80°C.

3.7.2 Western Blot

Primärantikörper

	<i>Tubulin</i>	<i>Drosha</i>	<i>Dicer</i>	<i>p-Akt</i>	<i>pFoxO1</i>
<i>Wirt</i>	Kaninchen	Kaninchen	Maus	Maus	Maus
<i>Isotyp</i>	IgG polyklonal	IgG polyklonal	IgG monoklonal	IgG polyklonal	IgG polyklonal
<i>Konz.</i>	200 µg/ml	0,1 mg/ml	1 mg/ml	100 µg/ 892 µl	100 µg/ 751 µl
<i>Verwendete Verdünnung</i>	1: 7000	1: 400	1: 1000	1:500	1:250
<i>Lagertemp.</i>	-20°C	-20°C	-20°C	-20°C	-20°C
<i>Firma</i>	Sigma	abcam	abcam	Upstate	Upstate

Sekundärantikörper

	<i>Sc2005 mouse</i>	<i>SC2004 rabbit</i>
<i>Isotyp</i>	IgG-HRP	IgG-HRP
<i>Wirt</i>	Ziege	Ziege
<i>Konzentration</i>	200 µg/500 µl	200 µg/500 µl
<i>verwendete Verdünnung</i>	1: 2000	1: 2000
<i>Lagertemperatur</i>	2- 8° C	2- 8° C
<i>Firma</i>	Santa Cruz	Santa Cruz

Proteinbestimmung:

Zur Proteinbestimmung wurde der DC Protein Assay der Firma BioRad benutzt.

Reagent A

1-5% Natriumhydroxid

<1% Natriumtartrat

<1% Kupfersulfat in destilliertem Wasser

Reagent B

<1% Lithiumsulfat

<1% Tungstische Säure

<1% Molybden Säure

<1% Salzsäure

<1% Phosphorische Säure in destilliertem Wasser

Reagent S

5-10% Natriumdodecylsulfat in destilliertem Wasser

Die Proteinbestimmung wurde mittels des DC Protein Assay der Firma BioRad durchgeführt, der auf der modifizierten Methode nach Lowry beruht.

BSA (Bovines Serum Albumin 0,17 µg; 0,35 µg; 0,7 µg; 1,4 µg) wurde in Form einer Standardkurve als interner Standard verwendet, um den Proteingehalt in µg/µl zu bestimmen. Die Messreihe bestand nun jeweils aus

5 µl RIPA-Puffer als Kontrolle, dessen Wert vom Proteingehalt der Proben abgezogen wurde und jeweils 5 µl jeder Probe, die in Küvetten gegeben und mit Aqua dest. auf 10 µl aufgefüllt wurden. In alle Küvetten wurden 25 µl Reagenz A/S (1000 µl Reagenz A + 20 µl Reagenz S) und 200 µl Reagenz B zugegeben. Nach 15 Min Inkubationszeit bei Raumtemperatur war der Farbumschlag abgeschlossen und die maximale Absorption bei 750 nm konnte mittels eines Photometers bestimmt werden.

Proteinaufbereitung

Alle folgenden Schritte der Proteinaufbereitung fanden auf Eis statt.

Pro Probe wurden 20 µg Gesamtprotein eingesetzt.

Das der Proteinmenge entsprechende Lysat-Volumen wurde in ein 1,5 ml Eppendorfhütchen pipettiert und auf gleiches Volumen mit Aqua dest. aufgefüllt. Zu den Proben wurde nun 1:10 DTT (500 mM), um Disulfidbrücken zu reduzieren, und 4 x Ladepuffer gegeben. Das im Ladepuffer enthaltene SDS umhüllt bei diesem Schritt die Proteine und versieht sie so entsprechend ihrer Größe mit einer negativen Ladung. Vor dem Beladen des Gels wurden die Proben 10 Min bei 70°C inkubiert, um Sekundär- und Tertiärstrukturen durch das Unterbrechen von Wasserstoffbrücken und das Strecken der Moleküle aufzubrechen.

SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE)

Bei der SDS-PAGE werden Proteine entsprechend ihrer Größe in einem Gel aufgetrennt. SDS ist ein anionisches Tensid, dass im Verhältnis 1,4 g SDS je 1 g Protein bindet und so die eigentliche Ladung der Proteine überdeckt. So können diese im elektrischen Feld gemäß ihrer Ladung und dementsprechend Größe aufgetrennt werden.

Die Elektrophoresekammer des verwendeten vertikalen Systems besteht aus einer oberen und einer unteren Kammer. Das zwischen den beiden Glasplatten befindliche Gel bildet die einzige Verbindung zwischen den beiden Kammern und gewährt den Stromfluss von Kathode zu Anode. Nach Befüllung der Kammern mit Elektrophoresepuffer (MOPS für Proteine > 60 kDa, MES für Proteine < 60 kDa, beide Fa. Invitrogen) wurden die aufbereiteten Proteinlysate, sowie 10 µl eines Markers (PeqGold Protein Marker IV, Peqlab)

in die entsprechenden Geltaschen geladen. Die Elektrophorese lief mit 150 V über einen Zeitraum von etwa einer Stunde. Die sichtbaren Banden des Markers zeigten hier die ausreichende Laufweite der Proteine an.

Transfer

Waschpuffer

1 x PBS
0,1% Tween 20 (vor Gebrauch zugeben)
pH 7,6
ad 1 Liter H₂O

Blocklösung

1 x PBS
0,1% Tween
5% Magermilchpulver

Für den weiteren Nachweis wurde das Gel aus der Elektrophoresekammer entnommen und mittels des iBlots-Systems (dry Western Blot) von Invitrogen auf eine Membran transferiert.

Die Membran wurde entweder direkt für die weitere Immundetektion verwendet oder bei +8° C bis zur weiteren Verwendung aufbewahrt.

Immundetektion

Die Membran wurde in ein 50 ml Greiner Röhrchen gelegt und im Folgenden drehend mit verschiedenen Lösungen behandelt. Zunächst wurden unspezifische Bindungsstellen der Membran durch Inkubation in Blocklösung über 1 Stunde geblockt. Anschließend wurde der jeweilige Primärantikörper in der entsprechenden Konzentration in Blocklösung verdünnt über Nacht bei 4°C mit der Membran inkubiert. Um nichtgebundene Antikörper zu entfernen, wurde die Membran am Folgetag 3 x 10 min in Waschpuffer geschwenkt. Dann wurde der Sekundärantikörper in der entsprechenden Konzentration nach den Angaben des Herstellers für 1 Stunde auf die Membran gegeben und erneut gewaschen.

Die Detektion der spezifischen Proteine erfolgte mittels eines verstärkten Chemilumineszenz-Systems (ECL+) der Firma Amersham. Die Membran wurde für 5 Min in der ECL+ Lösung inkubiert, wobei die an den Sekundärantikörper gebundene Meerrettichperoxidase (horseradish peroxidase; HRP) die chemilumineszierende Lösung aktivierte.

Anschließend wurde die Membran in einer Dunkelkammer auf einem hochsensitiven Röntgenfilm exponiert und der Film entwickelt.

3.8 Genomics

3.8.1 RNA Isolation

Zur RNA Isolation wurde das RNeasy Kit von Qiagen benutzt. Zur Isolation aus Gewebe wurde ein etwa 5 mg schweres, frisch isoliertes Gefäßstück mit einem Skalpell auf einem Objektträger zerkleinert und dann in ein vorbereitetes 2ml Reaktionsgefäß mit vorgelegten 350 µl RLT Puffer (1:100 mit β -Mercaptoethanol) überführt. Mit einem Handhomogenisator wurde das Gefäß weiter zerkleinert, dann die Gewebereste mit einer Zentrifugation für 2 min bei 13.000 x g abgetrennt und der Überstand zur weiteren Isolation auf eine Qia-Shredder Säule pipettiert.

Zur Isolation von RNA aus Zellen wurde das Medium von den Zellen abgesaugt und 350 µl RLT Puffer auf die Kulturschale gegeben. Die Zellen wurden mit einem Zellschaber abgelöst und auf eine Qia-Shredder Säule überführt. Die Qia-Shredder-Säule wurde für 2 min bei 13.000 x g zentrifugiert. Das Eluat wurde in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß pipettiert und mit gleichem Volumen an 70% Ethanol vermischt. Die Lösung wurde auf eine Rneasy Säule, die eine Silica-Membran enthielt, gegeben und 15 sek bei ≥ 8000 x g zentrifugiert. Dann wurden 350 µl RW1 Puffer auf die Säule gegeben und 15 sek bei ≥ 8000 x g zentrifugiert. Nachfolgend fand ein Dnase-Verdau statt. Zur Vorbereitung wurden 10 µl Dnase I Stocklösung mit 70 µl RDD Puffer vorsichtig vermischt (nicht gevortext, da Dnase sehr empfindlich ist). 80 µl dieser Lösung wurde auf die Säule pipettiert und für den Verdau 15 min bei Raumtemperatur inkubiert. Die Säule wurde nun erneut mit 350 µl gewaschen und 15 sek bei ≥ 8000 x g zentrifugiert. Dann wurden zweimal 500 µl RPE

Puffer auf die Säule gegeben und beim ersten Mal 15 sek bei $\geq 8000 \times g$ zentrifugiert, beim zweiten Mal 2 min bei $\geq 8000 \times g$. Die Säule wurde zum Trocknen in ein neues Reaktionsgefäß platziert und 1 min bei $13.000 \times g$ zentrifugiert. Zum Eluieren der RNA wurde die Säule in ein Elution Tube gesetzt und 30-50 μl RNase freies Wasser auf die Säule gegeben bevor 1 min bei $\geq 8000 \times g$ zentrifugiert wurde. Die Konzentrationsbestimmung fand mittels Nanodrop statt (ND-1000 Spectrometer, Peqlab). Zur Lagerung wurden die Proben mit $\text{N}_2(\text{l})$ schockgefroren und bei -80°C eingefroren.

3.8.2 miRNA Isolation

Für die Isolation von miRNA aus Zellen oder Gewebe wurde das PureLink miRNA Isolationskit der Firma Invitrogen verwendet.

Sollte miRNA aus Gewebe isoliert werden, wurden etwa 5 mg Gewebe mit einem Skalpell in 100 μl Binding Buffer auf einem Objektträger zerkleinert. Mit weiteren 200 μl Binding Buffer wurde das Gewebe in ein 2 ml Reaktionsgefäß gespült und dort weiter mit einem Handhomogenisator zerkleinert. Zusätzlich wurde das Lysat 30 sek gevortext bevor mit der weiteren Isolation fortgefahren wurde.

Zur Isolation von miRNA aus Zellen wurde das Medium von den Zellen abgesaugt und 300 μl Binding Buffer in die Kulturschale gegeben. Die Zellen wurden mit einem Zellschaber gelöst, in ein Eppendorfhütchen überführt und auch hier 30 sek gevortext.

Zur Isolation wurden die Proben zunächst 5 min bei $12.000 \times g$ zentrifugiert. Der Überstand wurde in ein Eppendorfhütchen mit vorgelegten 290 μl 70% Ethanol pipettiert, kurz gevortext und dann auf eine Säule des Kits gegeben. Zentrifugiert wurde 1 min bei $12.000 \times g$. Zum Eluat wurden 700 μl abs. Ethanol gegeben und durch auf- und abpipettieren vermischt. 700 μl der Lösung wurden auf eine neue Säule gegeben und 1 min bei $12.000 \times g$ zentrifugiert. Das Eluat wurde verworfen und die restliche Probe ebenfalls auf die Säule gegeben und wieder 1 min bei $12.000 \times g$ zentrifugiert. Die Säule wurde nun in ein neues Washing Tube gesetzt und 3 x mit jeweils 500 μl Washing Buffer gewaschen, gefolgt von jeweils einer 1 min Zentrifugation. Die Eluate wurden verworfen. Nun wurde die Säule in ein neues Washing

Tube gesetzt und 2-3 min bei 13.000 x g zentrifugiert. Die getrocknete Säule wurde in ein Recovery Tube gesetzt und 50 µl Rnase freies Wasser auf die Säule pipettiert, 1 min inkubiert und 1 min bei 12.000 x g zentrifugiert.

Die Konzentrationsbestimmung der isolierten miRNA erfolgte mittels Nanodrop (ND-1000 Spectrometer, Peqlab). Zur Lagerung wurden die Proben mit N_{2(l)} schockgefroren und bei -80°C eingefroren.

3.8.3 Reverse Transkription

Um die Transkription eines Genes nachzuweisen, wird dessen Expression auf RNA-Ebene detektiert. Hierfür wird die RNA mittels einer Reversen Transkriptase in cDNA umgeschrieben und diese später in einer real-time Reaktion amplifiziert und detektiert.

3.8.3.1 Reverse Transkription: RNA

Für eine 20 µl Reaktion galt das folgende Pipettierschema:

5 x RT Buffer	4 µl
DTT (100 mM)	2,5 µl
RNase Inhibitor (30 U/µl)	0,5 µl
Random Primer (50 A ₆₀ Units)	1,5 µl
dNTPs (10 nM)	1 µl
RT (200 U/µl)	1 µl

diesen 10,5 µl wurden je Reaktion einheitliche Konzentrationen an RNA beigegeben und das Volumen mit RNase-freiem Wasser auf 20 µl aufgefüllt. Bei mehreren Reaktionen wurde ein Mastermix mit 15% Pipettierverlust vorpipettiert. Die Reaktion wurde 60 min bei 37°C, dann 15 min bei 95°C inkubiert. Die resultierende cDNA wurde bei -20°C gelagert oder auf Eis bis zur real-time PCR aufbewahrt.

3.8.3.2 Reverse Transkription: miRNA

(miScript Reverse Transcription Kit, Qiagen)

Ein wichtiger Unterschied zwischen miRNA und RNA ist, dass miRNA nicht polyadenyliert ist. Daher beinhaltet die reverse Transkription von miRNAs auch eine poly(A)Polymerase, so dass Polyadenylation und reverse Transkription mittels oligo(dT)Primer parallel ablaufen. Zusätzlich enthält der oligo(dT)Primer einen universellen Anhang, der später bei der real-time PCR als Sequenz für den Forward Primer genutzt wird.

Hierfür wurden je Reaktion 4 µl miScript RT Buffer (5x), 1 µl miScript RT Mix und eine einheitliche Konzentration an miRNA auf Eis zusammen pipettiert und das Volumen mit RNase-freiem Wasser auf 20 µl aufgefüllt. Bei mehreren Reaktionen wurde ein Mastermix mit 15% Pipettierverlust vorpipettiert. Die Reaktion wurde 60 min bei 37°C, dann 5 min bei 95°C inkubiert. Die resultierende cDNA wurde bei -20°C gelagert oder auf Eis bis zur real-time PCR aufbewahrt.

3.8.4 Real-time PCR

Bei der real-time PCR wird ein cDNA Template mittels spezifischer Primer über 40 Reaktion-Zyklen amplifiziert und dies durch kontinuierliche Fluoreszenzmessung detektiert. Das Fluoreszenzsignal entsteht durch Anlagerung von SybrGreen an die entstehende doppelsträngige DNA. Für die weiteren Berechnungen wurde der jeweilige Ct-Wert verwendet, d.h. der Zyklus, an dem die Fluoreszenz signifikant über die Hintergrund-Fluoreszenz ansteigt. Die relative Regulation eines Gens wurde mittels der Formel $2^{\Delta Ct(\text{control}) - \Delta Ct(\text{treatment})}$ berechnet ($\Delta Ct = Ct(\text{Gen}) - Ct(\text{Referenzgen})$). Dabei wird die Genexpression jedes Gens gegenüber einem internen Standardgen normalisiert. Die Amplifikations-effizienzen aller Primer lagen bei etwa 100%. Die Messungen wurden mit dem MxPro3000 von Stratagen durchgeführt.

3.9.4.1 Real-time PCR: RNA

Für die real-time PCR für RNA wurde mit dem Kit SensiMix (Peqlab) gearbeitet. Als internes Standardgen wurde GAPDH für Mensch bzw. 18S für Maus benutzt. Primer wurden mit Hilfe des Programmes Primer3 designt und von MWG als HPSF aufgereinigt bezogen. Bei mehreren Reaktionen wurde ein Mastermix mit 15% Pipettierverlust vorpipettiert.

Je Reaktion galt das folgende Pipettierschema:

PCR-Mix:	10 µl
SybrGreen:	0,4 µl
cDNA:	1 µl
Forward Primer:	0,6 µl
Reverse Primer:	0,6 µl
H ₂ O:	7,4 µl

Folgendes Programm wurde verwendet:

8:30 min	95°C	zur Aktivierung der HotStart Polymerase
40 Zyklen:	30 sek	95°C
	30 sek	53°C
	30 sek	72°C
+ Schmelzkurve		

Verwendete Primer:

Primer	Sequenz (5' – 3')
GAPDH (human), forward	TGCACCACCAACTGCTTAGC
GAPDH (human), reverse	GGCATGGACTGTGGTCATGAG
18S (murin), forward	CGGCTACCACATCCAAGGAA
18S (murin), reverse	AGCTGGAATTACCGCGGC
Dicer (human), forward	TGACTTGCTATGTCGCCTTG
Dicer (human), reverse	TAGTCCCAAAATGCGAGGAC
Drosha (human), forward	ATCGGTTGTTCTGAACCTG
Drosha (human), reverse	GGTTGTCACTCCAACGGTCT
Dicer (murin), forward	AAGCAAAAAGGTCAGCAACTG
Dicer (murin), reverse	GCAGTCTTTTGTTCATTTTCATCC
Drosha (murin), forward	GGAGAAAGGATAGGCTGTGG
Drosha (murin), reverse	TGCTCTCTTTCCACCTCAT

3.8.4.2 Real-time PCR; miRNA

Für die real-time PCR für miRNA wurde mit dem miScript SYBR Green PCR Kit (Qiagen) gearbeitet. Als internes Standardgen wurde U6 für Mensch bzw. sno135 für Maus benutzt. Bei mehreren Reaktionen wurde ein Mastermix mit 15% Pipettierverlust vorpipettiert.

Je Reaktion galt das folgende Pipettierschema:

2xQuantiTect Master-Mix:	10 µl
10x miScript Universal Primer:	2 µl
cDNA:	1 µl
Spezifischer Primer:	1 µl
H ₂ O:	6 µl

Folgendes Programm wurde verwendet:

15 min 95°C zur Aktivierung der HotStart Polymerase
 40 Zyklen: 15 sek 94°C
 30 sek 55°C
 30 sek 70°C
 + Schmelzkurve

Verwendete Primer:

Primer	Sequenz (5' – 3')
U6	AAATTCGTGAAGCGTTCCAT
sno135	TGGTGAGCCTATGGTTTTCTG

Die spezifischen Primer für die untersuchten miRNAs entsprechen den miRNA-Sequenzen, wie sie auf der Homepage von Sanger veröffentlicht sind (<http://microrna.sanger.ac.uk/sequences/>).

3.8.5 PCR Array

Um ein Screening der Expression von Genen, die in der Zellzyklusregulation eine Rolle spielen, durchzuführen wurde das RT² Profiler PCR Array System von SuperArray benutzt.

Dieses System bietet 96 well plates, die in den wells bereits Primer in lyophilisierter Form enthalten, so dass nur die cDNA mit dem Reaktionsmix dazu pipettiert werden musste. Ein Array enthielt 84 Zellzyklusgene, sowie 5 interne Standardgene, eine Kontrolle für genomische DNA-Verunreinigungen, 3 Reverse Transkriptionskontrollen und 3 positive PCR Kontrollen.

Bei der RT-Reaktion für den PCR-Array fand der DNase-Verdau vor der eigentlichen Reaktion statt. Hierfür wurde 1 µg RNA mit 2 µl GE (5x gDNA Elimination Buffer) vermischt und mit RNase-freiem Wasser auf ein Volumen von 10 µl aufgefüllt. Die Reaktion wurde 5 min bei 42°C, dann auf Eis für 1 min inkubiert.

Eine RT-Reaktion wurde wie folgt angesetzt:

BC3 (5x RT Buffer 3)	4 µl
P2 (Primer & External Control Mix)	1 µl
RE3 (RT Enzyme Mix 3)	2 µl
RNase-freies H ₂ O	3 µl

10 µl dieses Reaktionsansatzes wurde zu jedem RNA-Ansatz gegeben und die Reaktion bei 42°C für 15 min inkubiert. Um die RNA zu degradieren und die RT zu inaktivieren, wurde dann für 5 min die Temperatur auf 95 °C erhöht. Nun wurden 91 µl ddH₂O dazu pipettiert und vermischt.

Für die real-time PCR wurde der folgende Ansatz pipettiert:

2x SuperArray RT ² PCR Master Mix	1275 µl
cDNA Ansatz	102 µl
ddH ₂ O	1173 µl

Von diesem Ansatz wurden nun je 25 µl in jedes well des 96 well plates pipettiert und die Reaktion wie unter „real-time PCR: RNA“ gestartet und ausgewertet.

3.8.6 Chromatin-Immunpräzipitation (ChIP)

(ChIP It Express Enzymatic, Active Motif)

Mittels Chromatin-Immunpräzipitation (ChIP) lässt sich feststellen, ob ein Transkriptionsfaktor an eine bestimmte Region des Chromatins bindet.

In diesem Experiment sollte die Bindung von FoxO1 an die Promoterregion von Dicer in SMCs unter basalen und unter Wachstumsbedingungen untersucht werden.

Fixierung der Zellen

Im ersten Schritt wird die Protein-DNA-Bindung durch Formaldehyd fixiert und die Zellen geerntet. Hierfür wurden SMCs in 10 cm Schalen ausgesät und bei 70-80% Konfluenz für 24 Std. mit Basalmedium behandelt. Untersucht werden sollte die Bindung von FoxO1 an die Promoterregion unter basalen und Wachstumsbedingungen. Daher wurde die Hälfte der Schalen für 20 min mit Wachstumsmedium, das 20% FCS enthielt inkubiert bevor sie fixiert wurden, die anderen Schalen blieben bei Basalmedium.

Fixierungslösung

10 ml BM

270 µl 37 % Formaldehyd

Glycin Stop-Fix Lösung

10 ml 10 x Glycine Buffer

10 ml 10 x PBS

80 ml dH₂O

gut vermischen und bei RT stehen lassen

Lösung A

je Schale 1 ml 1 x PBS auf Eis vorinkubieren

direkt vor Benutzung + 5 µl PMSF

Das Medium wurde von den Zellen abgesaugt und durch jeweils 10 ml Fixierungslösung ersetzt. Die Schalen wurden 10 min bei RT auf einem Plattform Mischer inkubiert. Nun wurde mit eiskaltem 1 x PBS gewaschen, dann 5 ml Glycin Stop-Fix Lösung zu jeder Schale gegeben. Um die Fixierung vollständig zu stoppen wurden die Schalen 5 min schwenkend bei RT inkubiert. Nach erneutem Waschen mit eiskaltem 1 x PBS wurde 1 ml Lösung A zu jeder Schale gegeben und die Zellen mit einem Zellschaber abgelöst und

in eine Eppendorfhütchen überführt. Die Zellbestandteile wurden durch Zentrifugation für 10 min bei 2500 rpm und 4°C pelletiert, der Überstand wurde verworfen.

Enzymatischer Verdau

In diesem Schritt werden die Zellen aufgeschlossen und das Chromatin enzymatisch verdaut.

Lysepuffer

1 ml Lysepuffer

5 µl PIC (Proteininhibitor-Cocktail)

5 µl PMSF (Phenylmethylsulfonylfluorid)

Enzymatischer Lysepuffer

Enzymatischer Shearing Puffer 1:100 mit 50% Glycerol verdünnt

Lösung B

350 µl Verdauungspuffer

1,75 µl PIC

1,75 µl PMSF

Im Folgenden wurde jedes Pellet in 1 ml eiskaltem Lysepuffer resuspendiert und die Lösung wurde 30 min auf Eis inkubiert. Dann wurde die Lösung in einen auf Eis vorgekühlten Dounce Homogenisator (Sartorius) überführt und auf Eis 15 mal gepottet. Im Anschluss wurde die Zellsuspension in ein 1,7 ml Eppendorfhütchen überführt und bei 5000 rpm 10 min bei 4°C zentrifugiert. Jedes Pellet wurde mit 353 µl Lösung B resuspendiert und bei 37°C für 5 min inkubiert. Zu den vorgewärmten Zellkernen wurden dann jeweils 17 µl Enzymatischer Lysepuffer gegeben und unter regelmäßigem Vortexen weitere 12,5 min bei 37°C inkubiert.

Zum Stoppen der Reaktion wurde jeweils 7 µl eiskaltes EDTA zugeben und die Ansätze 10 min auf Eis inkubiert. Anschließend wurde bei 4°C für 10 min

bei 15.000 rpm zentrifugiert und die Überstände in neue Eppendorfhütchen überführt, sie enthalten das Chromatin.

Immunpräzipitation

Während der Immunpräzipitation werden mittels spezifischer FoxO1 Antikörper die DNA-FoxO1 Komplexe isoliert und aufgereinigt.

10 µl des Chromatins wurden für als Input DNA bis zur abschließenden PCR bei -20°C gelagert.

Für die Immunpräzipitationen wurden für die beiden Bedingungen jeweils die folgenden Reaktionen angesetzt und gut vermischt:

Reagenz	Foxo Reaktion	IgG Reaktion
Protein G Magnetic Beads	25 µl	25 µl
ChIP Buffer 1	10 µl	10 µl
Chromatin	44 µl	44 µl
PIC	1 µl	1 µl
dH ₂ O	9 µl	-
Antikörper	1 µl (= 2 µg)	10 µl (= 3 µg)
Hering Sperm DNA (Biolabs, 10 mg/ml)	10 µl	10µl
TOTAL VOLUME	100 µl	100 µl

Antikörper:

FoxO1: FKHD (H-128)X (Santa Cruz), c = 200 µg/0,1 ml

IgG: IgG (Active Motif), c = 0,2 mg/ml

Die Immunpräzipitation wurde bei 4°C für 4 Stunden rotierend inkubiert.

Anschließend wurden die Magnetic Beads anzentrifugiert und im Magnetständer pelletiert. Der Überstand wurde verworfen und die Beads jeweils zweimal mit 800 µl ChIP Puffer 1 und anschließend ChIP Puffer 2 gewaschen.

Elution und Aufreinigung des Chromatins

In diesem Schritt wurden die FoxO1-DNA-Komplexe eluiert, die Protein-DNA-Bindung gelöst und das Protein degradiert.

Die pelletierten Beads wurden mit 50 µl ElutionsPuffer AM2 resuspendiert und 15 min rotierend bei RT inkubiert. Nach kurzem Anzentrifugieren wurde

- ohne vorheriges Absaugen des Puffers - 50 µl vom Reverse Cross-Link Puffer zugegeben, um das Chromatin zu eluieren, und der Reaktionsansatz sofort in den Magneten gestellt, um die Beads zu pelletieren. Der Überstand wurde jeweils in ein neues Eppendorfhütchen überführt. Als zusätzliche Reaktion wurden die zurückgelegten 10 µl Input DNA-Proben jeweils mit 88 µl ChIP Puffer 2 und 2 µl 5 M NaCl vermischt. Alle Proben wurden bei 95°C für 15 min inkubieren, um die DNA-Protein-Bindungen zu zerstören. Anschließend wurden 2 µl Proteinase K zu jeder Reaktion gegeben, um die Proteine zu degradieren und für 1 Std. bei 37°C inkubiert. Um die Reaktion zu arretieren wurden jeweils 2 µl Proteinase K Stop Lösung zu jedem Ansatz pipettiert und die DNA bis zur PCR bei -20°C gelagert.

PCR

Für die PCR wurden jeweils 2 µl DNA eingesetzt und entsprechend 3.9.4.1 durchgeführt.

Verwendete Primer:

Primer	Sequenz (5' – 3')
FoxO1- 1	GGAAGTGGGTGTTTGTATTTC
FoxO1- 2	CTAAGTTTGGCAGACTCTCTGAGC

3.8.7 Microarrays

Mittels Microarrays läßt sich die Expression von Genen auf mRNA bzw. miRNA-Ebene analysieren. Für die Analyse wird RNA/miRNA aus einer Probe sowie einer Referenzprobe isoliert, verschieden fluoreszenzmarkiert und gemeinsam auf einen Microarray hybridisiert. Dieser enthält in der Regel alle bekannten Gensequenzen einer Spezies. Die markierte RNA/miRNA bindet an ihre komplementäre DNA auf dem Array und gibt beim nachfolgenden Scannen durch die Intensität ihres Fluoreszenzsignals an, wie das jeweilige Gen exprimiert wurde.

3.8.7.1 Microarray: miRNA

Microarrays zur Untersuchung der Expression von miRNAs wurden von der Firma LC Sciences durchgeführt.

Für die Arrays wurden Microfluid μ Paraflo[®] Chips benutzt, deren Vorteil in einem sehr geringen Probenbedarf liegt. Die miRNA Proben wurden amplifiziert und jeweils zwei zu vergleichende Bedingungen mit cy3 bzw cy5 Fluoreszenzfarbstoffen gekoppelt. Diese Vergleichspaare wurden nun auf jeweils einem Array hybridisiert und nach einigen Waschschritten das Emmissionssignal der Fluoreszenzfarbstoffe detektiert. Die Intensität der Fluoreszenzsignale korreliert mit der miRNA-Konzentration der Probe.

3.8.8 RNAi – RNA Interferenz

In der Forschung werden synthetisch hergestellte siRNAs eingesetzt, um durch RNA Interferenz die Expression von spezifischen Zielgenen zu verringern. Die siRNAs werden in doppelsträngiger, verlängerter Form in Zellen eingebracht (transfiziert), dort in den Proteinkomplex RISC eingebunden und in die aktive Form gespalten – ähnlich wie miRNAs. Der ganze Komplex bindet dann an die komplementäre Ziel-mRNA und führt zu deren Degradation. Die resultierende Verringerung der Genprodukte ermöglicht es, Hinweise auf die physiologische Bedeutung des betreffenden Genes zu erhalten.

Bei den in dieser Arbeit verwendeten Transfektionsreagenzien (Lipofektamin, Neo siPORT Fx) handelt es sich um lipid-basierte Medien, die die negativ geladenen siRNAs in Aggregate komplexieren, die so leichter von den Zellen durch Endocytose aufgenommen werden.

3.8.8.1 Transfektion mit siRNA

Für eine Transfektion wurden die Zellen so ausgesät, dass sie am Folgetag zu 70% konfluent waren. Das folgende Protokoll bezieht sich auf die Transfektion in 6 cm Schalen und eine Zellzahl von etwa 250.000 SMCs.

Die konfluenten Zellen wurden mit Opti-MEM gewaschen und dann 2 ml Medium je Schale vorgelegt. Bis zur eigentlichen Transfektion wurden die Zellen im Brutschrank aufbewahrt.

Für einen Transfektionsansatz wurden 300 µl Opti-MEM mit 3 µl Lipofektamin vermischt und 15 min bei Raumtemperatur inkubiert. Dann wurden in einem neuen Ansatz 300 µl Opti-MEM mit 100 nM siRNA angesetzt, nach der Inkubation dem ersten hinzugegeben, so dass die siRNA mit dem Transfektionsmedium Lipidkomplexe ausbilden kann, und erneut 15 min inkubiert. Für eine MOCK-Kontrolle wurden 600 µl Opti-MEM mit 3 µl Lipofektamin vermischt und 30 min inkubiert. Nun wurden je Schale 600 µl Transfektionsansatz zu den Zellen gegeben und 24 Std. im Brutschrank inkubiert. Bei jedem Experiment wurden eine MOCK-Kontrolle, sowie eine Transfektion mit einer Kontroll-siRNA, die nachweislich keine mRNA bindet, durchgeführt.

Verwendete siRNAs:

siRNA	Sequenz (5' – 3')/Produkt
Kontrolle; human	Non-Targeting siRNA #2, Dharmacon
Dicer, human	ON-TARGET Plus Smart Pool, Dharmacon
Drosha, human	ON-TARGET Plus Smart Pool, Dharmacon
Kontrolle, murin	UAAUGUAUUGGAACGCAUAUUTT
Dicer, murin	GCUCUUUCAUGUUAUUGAATT
Drosha, murin	CUACCUGUUUCCUAGCUUGTT
siFoxO1, human	CAACCUGUCACUGCAUAGUTT

3.8.8.2 Reverse Transfektion mit miRNA-Precursoren

Bei der reversen Transfektion findet das Aussähen der Zellen und die Transfektion in einem Schritt statt, was Zeit erspart und auch die Transfektionseffizienz erhöht, da die eigentlich adherenten Zellen freischwimmend womöglich eine größere Oberfläche für die Transfektion bieten.

Vor Beginn der Transfektion wurden die Zellen trypsinisiert, in Medium resuspendiert und gezählt. Für eine Transfektion im 6well plate wurden die Zellen so verdünnt, dass ein Volumen von 2,4 ml 75.000 SMCs enthielt.

Für einen Transfektionsansatz wurden nun 9 µl siPORT Neo Fx Transfektionsmedium (Ambion) mit 291 µl Opti-MEM verdünnt und der Ansatz 10 min inkubiert. Dann wurden 100 nM miRNA-Precursor (Pre-miR, Ambion) mit Opti-MEM auf ein Volumen von 300 µl aufgefüllt, zum ersten Ansatz dazu gegeben und erneut 10 min inkubiert.

Diese 600 µl des vollständigen Transfektionsansatzes wurde nun in jedes well des 6 well plates vorgelegt, die Zellen im Volumen von 2,4 ml dazu pipettiert und gut vermischt und verteilt. Die Zellen wurden 24 Std. im Brutschrank mit dem Transfektionsmedium inkubiert.

3.8.8.3 Reverse Transfektion mit miRNA-Inhibitoren

MiRNA-Inhibitoren (Clear-miRs) wurden von der Firma Eurogentec bezogen. Es handelt sich hierbei um chemisch modifizierte, komplementäre RNA-Moleküle, die für *in vivo*-Versuche in der zusätzlich chemisch stabilisierten Variante Clear-miR Plus erhältlich sind.

Vor Beginn der Transfektion wurden die Zellen trypsinisiert, in Medium resuspendiert und gezählt. Für eine Transfektion im 6well plate wurden hier die Zellen so verdünnt, dass ein Volumen von 2 ml 75.000 SMCs enthielt.

Für einen Transfektionsansatz wurden nun 3 µl Lipofektamin mit 297 µl Opti-MEM verdünnt und der Ansatz 15 min inkubiert. Dann wurden 100 nM Clear-miR mit Opti-MEM auf ein Volumen von 300 µl aufgefüllt, zum ersten Ansatz dazu gegeben und erneut 15 min inkubiert.

Diese 600 µl des vollständigen Transfektionsansatzes wurde nun in jedes well des 6 well plates vorgelegt, die Zellen im Volumen von 2 ml dazupipettiert und gut vermischt und verteilt. Die Zellen wurden 24 Std. im Brutschrank mit dem Transfektionsmedium inkubiert.

3.8.8.4 *In vivo* Transfektion

Für die *in vivo* Transfektion wurde das Transfektionsreagent *in vivo* Jet PEI der Firma PolyplusTransfection benutzt.

Für den Transfektionsansatz wurden 20 µg *in vivo* modifizierte siRNA mit 5 % Glucoselösung auf ein Volumen von 10 µl verdünnt. Dann wurde das gewünschte Volumen *in vivo* Jet PEI ebenfalls mit 5 % Glucoselösung auf 10 µl verdünnt. Der Jet PEI-Ansatz wurde dann zu der verdünnten siRNA pipettiert, vermischt, anzentrifugiert und 15 min bei Raumtemperatur inkubiert. Die Menge an *in vivo* Jet PEI richtete sich nach dem optimierten

N/P-Verhältnis für jeden Versuch und berechnete sich wie folgt:

$$\mu\text{l } in\ vivo\ Jet\ PEI = \frac{(\mu\text{g DNA} \times 3) \times \frac{N}{P}\text{ ratio}}{150}$$

Für die *in vivo* Applikation wurden die 20 µl Transfektionsansatz dann mit 50 µl Pluronic Gel (35% NP-40 in 10% Glucoselösung) in einer 1 ml Spritze vermischt und bis zum Gebrauch bei 4°C aufbewahrt.

Um die Transfektionsmethode zu optimieren, wurde anfangs mit einer cy3-gelabelten Kontroll-siRNA (siGlo, Dharmacon) gearbeitet.

Um Dicer und Drosha herunter zu regulieren wurden die unter 3.9.8.1 genannten murinen Primer benutzt, da sie sich in der Zellkultur als am effektivsten erwiesen haben.

3.8.9 Virus Transduktion

Für den Gentransfer in Säugerzellen werden häufig Adenoviren des humanen Serotyps 5 als Vektortyp verwendet. Adenoviren können ein sehr breites Spektrum an Zelltypen und Geweben von unterschiedlichen Spezies infizieren und sind nicht auf aktive Zellteilung angewiesen.⁸¹ Desweiteren ist das adenovirale Genom (ca. 36 kb doppelsträngiger DNA) einfach zu modifizieren und lässt sich in hohem Maße produzieren.^{82, 83} Adenovirale Gene teilt man in „frühe“ und „späte“ Gene ein, da die Expression im Infektionszyklus zeitlich versetzt erfolgt. Die Gene der frühen Phase (E1, E2, E3 und E4) sind für die Virusreplikation und Genexpression essentiell, wohingegen die Gene der späten Phase hauptsächlich für virale Strukturproteine kodieren. Durch

Deletion einzelner Gene ist es möglich, fremde DNA in das Virusgenom zu integrieren und durch Infektion mit den manipulierten Viren diese fremde DNA in Säugerzellen zu exprimieren. Um dies zu erreichen bedient man sich der Deletion von E1 und/oder E3.⁸⁴ E1-defiziente Adenoviren sind Replikations-unfähig und nicht in der Lage, infektiöse Viruspartikel in der Zielzelle zu produzieren. Das E3-Gen wird benötigt, um eine Immunantwort zu umgehen. Adenovirale Vektoren mit E1- und E3-Deletion (pAd-Easy-1) bieten Raum für den Einbau von bis zu 8 kb fremder DNA über homologe Rekombination. Die Präparation der rekombinanten Viren erfolgt in stabil transfizierten Packungszellen (z.B. HEK 293), die die fehlenden Faktoren für die virale Replikation transkomplementieren.^{85, 86}

Die von HE et al. 1998 entwickelte Methode zur Produktion rekombinanter Adenoviren hat sich als äußerst effizient erwiesen. Fremde DNA wird zunächst in einen Shuttle Vektor kloniert, dessen *multiple cloning site* (MCS) von adenoviralen Sequenzen flankiert ist, was die homologe Rekombination mit pAd-Easy-1 ermöglicht. Nach homologer Rekombination in *E. coli* wird das Konstrukt zur Transkomplementation der fehlenden Gene in Packungszellen transfiziert.

Für diese Versuche wurde ein Vektor mit einer mutierten Variante von FoxO1 benutzt. Bei dieser wurde an drei Stellen der Sequenz eine Punktmutation zu Alanin durchgeführt, um die zelluläre Degradation von FoxO1 zu inhibieren. Die Vektoren pAdTrack-CMV und pAd-FoxO1(AAA) wurden linearisiert und in elektrokompente BJ5183 Zellen (Quantum Biotechnologies, Montreal, Canada) parallel zum pAdEasy-1 Vektor transformiert. Beide Vektoren koexprimieren das Grün fluoreszierende Protein (GFP) unter der Kontrolle eines separaten CMV Promoters, um erfolgreich transduzierte Zellen identifizieren zu können. Rekombinante adenovirale DNA wurde von Kanamycin-resistenten Kolonien isoliert und in TOP10 Zellen (Invitrogen, Karlsruhe) amplifiziert, mittels CsCl₂-Dichtegradientenzentrifugation aufgereinigt, linearisiert durch PacI-Verdau und transfiziert in 293 Zellen. Nach 7 bis 10 Tagen wurde der Virus benutzt um frische 293 Zellen zu infizieren. Der amplifizierte Virus wurde dann mittels Zelllyse durch

mehrmaliges Einfrieren und Auftauen isoliert und erneut durch CsCl₂-Dichtegradientenzentrifugation aufgereinigt.

Für die Versuche wurden 70% konfluente SMCs mit einer MOI (multiplicity of infection) von 50 transduziert.

3.9 Funktionelle Assays

3.9.1 Proliferationsassay

Die Proliferation von Zellen in Kultur wurde mittels des BrdU ELISA Kits von Roche bestimmt. Bei dem Assay wird den Zellen Bromodesoxy-Uridin – ein Pyrimidinanalogon – ins Medium beigegeben, welches proliferierende Zellen anstelle von Thymin in ihr Genom einbauen. Durch das Maß an eingebautem BrdU lässt sich auf die Proliferation der Zellen schließen.

Für die Versuche wurden 3.500 SMCs je well in 96well Mikrotiter-Platten ausgesät und entsprechend der Versuchsbedingungen behandelt. Nach 24 Std. wurde das Medium gewechselt und nach ca. 48 Std. die Proliferationsmessung gestartet. Hierfür wurde zu jedem well 100 µl Wachstumsmedium, sowie 10 µl BrdU labeling solution gegeben. Nach einer Inkubation von 2 Std. im Brutschrank wurden zusätzlich 10 µl Wst-1 zu jedem well pipettiert. Wst-1 wird von lebenden Zellen metabolisiert, was zu einem Farbumschlag von rot zu gelb führt und ein Maß für die Anzahl an lebenden Zellen darstellt. Nachdem dieser Farbumschlag erreicht wurde, wurde die Extinktion im ELISA-Reader gemessen und ausgewertet. Für die eigentliche Proliferationsmessung wurde das Medium der 96well Mikrotiter-Platten nach 6 Std. entfernt und 200 µl/well Fixierungslösung zugegeben, durch die die DNA denaturiert wurde. Dieser Schritt ist notwendig, damit das inkorporierte BrdU von einem Antikörper erreicht werden kann. Die Fixierungslösung wurde für 30 min bei Raumtemperatur auf den Zellen belassen. Nach dem Ausklopfen der Lösung wurden 100 µl/well anti-BrdU Lösung (enthält BrdU-Antikörper) auf die Zellen gegeben. Nach 90 min wurden die Zellen dreimal mit 200 µl Waschpuffer gespült. Die gebildeten Immunkomplexe konnten mit Hilfe einer Substratsolution (enthält fluorescein-gekoppeltes igG) sichtbar gemacht werden. 100 µl dieser Lösung wurden bei Raumtemperatur für 20- 30 min auf

den Zellen gegeben. Die Reaktion wurde nach einer ausreichenden blauen Farbentwicklung durch Zugabe von 25 µl 1 M H₂SO₄ gestoppt, ein Farbumschlag zu gelb resultiert. Mit Hilfe eines ELISA-Readers wurde die Extinktion bei 450 nm gemessen und die Farbentwicklung so quantifiziert.

3.9.2 Migrationsassay

Die Migrationsfähigkeit der Zellen wurde mit Hilfe von 24well- Transwell-Platten der Firma Corning Incorporated untersucht. Die Einsätze dieser Platten bestehen an ihrer Unterseite aus einer Polycarbonatmembran, diese besitzt unregelmäßig angeordnete 8 µm große Poren durch die die Zellen migrieren können. Um nach dem Durchwandern eine verbesserte Adhäsion der Zellen an der Unterseite der Membranen zu ermöglichen, wurden diese mit Gelatine (1,5%) beschichtet.

Für den Versuch wurden die Zellen in 10 cm Schalen ausgesät und entsprechend transfiziert. Nach 24 Stunden wurden die Zellen für weitere 24 Stunden mit serumfreiem Medium ruhend gesetzt. Anschließend wurden die Zellen trypsinisiert, in serumfreiem Medium resuspendiert und gezählt. In die obere Kammer der Einsätze wurden jeweils 5×10^4 Zellen in einem Volumen von 100 µl pipettiert. Die untere Kammer der Transwell- Platten wurde mit 600 µl Medium gefüllt, der Migrationsreiz wurde durch Zugabe von 20 % FCS ausgelöst. Die Platten wurden 24 Std im Brutschrank inkubiert und die nicht migrierten Zellen dann von der Oberseite der Transwelleinsätze mit einem Baumwolltupfer abgelöst. Die Transwell-Einsätze wurden nun in neue wells gesetzt, in denen bereits 300 µl Medium mit 30 µl WST-1 (1:10) vorgelegt wurde. Wst-1 ist ein Farbstoff, der von Zellen metabolisiert wird, was zu einem messbaren Farbumschlag von rot zu gelb führt. Der Grad des Farbumschlages steht in Relation zur migrierten Zellzahl. Daher wurde die Platte nun im Brutschrank inkubiert bis eine deutliche Gelbfärbung des Mediums erkennbar war. Für die Messung wurden 100 µl aus jedem well in eine 96well Mikrotiterplatte überführt und die Extinktion photometrisch mit Hilfe eines ELISA-Readers bei 450 nm Wellenlänge bestimmt.

3.9.3 Apoptoseassay

Die Apoptoserate von Zellen in Kultur wurde mit Hilfe des Cell Death Detection Elisa^{Plus} Kits von Roche ermittelt. Apoptose ist durch die Aktivierung von endogenen Endonukleasen gekennzeichnet, die Ca^{2+} - und Mg^{2+} -abhängig doppelsträngige DNA an den zugänglichen internukleosomalen Linker-Regionen spalten. Dabei entstehen Histon-assoziierte DNA-Fragmente, deren Zahl ein Maß die für Apoptose darstellt.

Für den jeweiligen Versuch wurden $3,5 \times 10^4$ Zellen/well in eine 96well Mikrotiter Platte ausgesät und entsprechend dem Versuch transfiziert. Nach 24 Std Inkubation im Brutschrank wurde für weitere 24 Std Apoptose induziert durch Zugabe von 1 M H_2O_2 . Anschließend wurde der „Cell Death Detection ELISA^{Plus}“ durchgeführt. Die 96 well Mikrotiterplatte wurde zunächst für 10 min bei 200 x g zentrifugiert um alle Zellen – auch tote - zu pelletieren. Der Überstand wurde vorsichtig abgesaugt und verworfen. Dann wurden die Zellen unter Zugabe von 200µl Lysepuffer über einen Zeitraum von 30 Minuten lysiert. Die Zellsuspension wurde bei 200 x g für 10 Minuten zentrifugiert, wodurch Zellkerne und unfragmentierte hochmolekulare DNA pelletiert wurde. Je 20µl des Überstandes wurden in Streptavidin-beschichtete Mikrotiterplatten überführt. Es wurde eine Lösung aus Inkubationspuffer, Anti-Histon-Biotin (ein Biotin-markierter monoklonaler Antikörper) und Anti-DNA-POD (ein Peroxidase-konjugierter monoklonaler Antikörper) hergestellt. Mit je 80µl dieser Lösung wurde der Zellüberstand für zwei Stunden inkubiert. Im Anschluß wurde die Mikrotiterplatte über einen Zeitraum von 5 min dreimal mit Inkubationspuffer gewaschen. Dann wurden die Proben mit 100µl ABTS, einem Substrat der Peroxidase, für 30 Minuten inkubiert. Die Absorption, der sich entwickelnden grünen Farbe, wurde photometrisch mit Hilfe eines ELISA- Readers bei 405 nm Wellenlänge quantifiziert. Als Referenzwellenlänge diente 490 nm. Die entwickelte Farbe und somit die Absorption korreliert direkt mit der Menge an Nukleosomen und somit der Anzahl apoptotischer Zellen.

3.10 Tierexperimentelle Arbeiten

Die in der Studie verwendeten C57BL/6N Mäuse wurden von der Firma Charles River (Charles River, Sulzfeld) bezogen.

Die nachfolgend beschriebenen Tierversuche erfolgten nach entsprechender Genehmigung durch das Regierungspräsidium Gießen (GI 20/10, 40/2002).

3.10.1 Narkose

Um die Narkose einzuleiten, wurde die Maus kurzzeitig mit Isofluran betäubt. Hierfür wurde ein Stück Watte mit dem Inhalationsnarkotikum getränkt und zu der Maus in eine Inhalationskammer gegeben. Dann wurde ihr die Narkose injiziert.

4 ml Ketamin Incesa wurden mit 1 ml Rompun 2% vermischt und anschließend 1:1 mit Kochsalzlösung (0,9% NaCl) verdünnt. Von dieser Lösung bekam die Maus, abhängig vom Gewicht, ca. 0,1 ml intramuskulär ins rechte Hinterbein intramuskulär injiziert. In dieser Dosierung dauerte die Narkose etwa ein bis zwei Stunden an.

Um vagale Reize durch die Narkose zu eliminieren, bekamen die Mäuse zusätzlich 0,1 ml Atropinsulfat in einer 1:10 Verdünnung ebenfalls intramuskulär injiziert.

3.10.2 Dilatation

Die narkotisierte Maus wurde auf dem Rücken liegend, mit Klebestreifen über den vorderen und hinteren unteren Extremitäten unter dem Gesichtsfeld des Mikroskops so befestigt, dass in der kleinsten Vergrößerung der gesamte Operationsbereich am Oberschenkel sichtbar war. Mit einem Skalpell wurde der Operationsbereich am linken Hinterbein der Maus rasiert und dieser anschließend desinfiziert.

Mit einer geraden Schere wurde entlang des vermuteten Verlaufs der A. femoralis, von distal nach proximal ein Hautschnitt gesetzt. Mit zwei stumpfen Pinzetten wurden die Gefäße vom Abgang der A. profunda femoris bis zum Übergang der A. femoralis in die A. iliaca externa

freigelegt, Nerv und Bindegewebe beiseite präpariert und die A. femoralis vorsichtig von der Vene getrennt.

Im Folgenden benötigte man zwei Fäden mit einer Länge von etwa 10 cm und der Stärke 7-0 zum Anschlingen der freigelegten Gefäße.

Mit diesen Fäden wurden die A.femoralis proximal und A. femoralis profunda nahe dem Abgang angeschlungen. Die Fäden wurden mit Klebestreifen am Fuß des Mikroskops fixiert.

Vor der Denudation wurde für 1 min Xylocain auf die Gefäße getropft, um sie zu erweitern. Die Fäden der angeschlungenen Gefäße wurden nun straff gezogen, um den Blutfluss kurzzeitig während der Denudation zu unterbrechen. An der A. profunda femoris wurde, etwas distal von deren Abgang, mit einer feinen Schere nach Vannas, ein kleiner Schnitt quer zur Verlaufsrichtung des Gefäßes gesetzt. Mittels einer kleinen, zuvor hakenförmig abgebogenen Injektionsnadel wurde das im Gefäß entstandene Loch erweitert und offen gehalten, um die Einführung des Denudationsdrahtes zu erleichtern.

Der Führungsdraht zur Denudation des Gefäßes wurde mit einer vorne gummierten Pinzette in das erweiterte Loch in der A. profunda femoris eingeführt und etwas vorgeschoben. Der Faden an der A. iliaca externa wurde leicht gelockert und der Draht bis zur A. iliaca externa vorgeschoben. Dort verblieb er eine Minute.

Nun wurde erneut etwas Xylocain auf die Arterie gegeben und der gelockerte Faden wieder gestrafft, bevor der Draht wieder entfernt werden konnte. Um eine Blutung zu verhindern wurde die A. profunda proximal und distal des Einschnittes mit Faden ligiert (Ethilon 8-0). Danach wurden die zum Anschlingen verwendeten Fäden wieder entfernt. Die A. femoralis sollte nach dem Eingriff wieder komplett perfundiert sein. Gegebenenfalls konnte nun das Pluronic Gel um sie herum appliziert werden. Abschließend wurde der Nerv, sowie beiseite präpariertes Gewebe wieder an die Gefäße gelegt und die Haut mit Einzelknopfnähten zugenäht. Nach der Operation wurde die Maus bis zum Erwachen unter eine Wärmelampe gelegt, um ein Auskühlen des Körpers zu vermeiden.

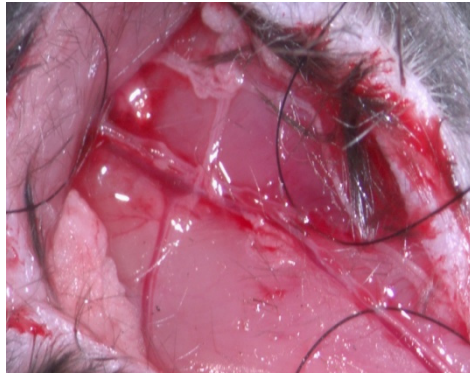


Abb. 4A: Präparation

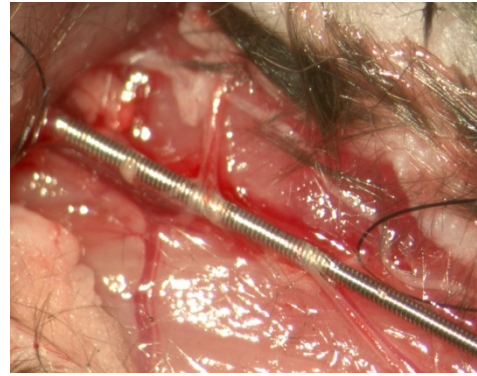


Abb. 4B: Dilatation

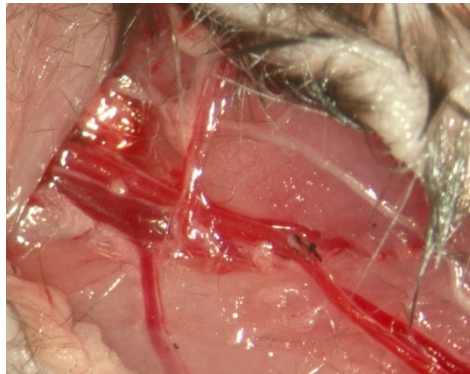


Abb. 4C: Wiederherstellung des Blutflusses

3.10.3 Fixierung des Gefäßes

Vor der Gefäßentnahme wurde die Maus durch eine Überdosis Isofluran eingeschläfert.

Um das Gefäßsystem der Maus intraluminal zu fixieren, wurde der Brustkorb eröffnet und der Blutkreislauf über eine linksventrikuläre Injektion von 2% Paraformaldehyd (PFA, in PBS verdünnt, pH = 7,4) vorsichtig gespült. Dieser Vorgang sollte mindestens fünf Minuten dauern, um eine ausreichende Inkubation des gesamten Gefäßes mit PFA zu gewährleisten. Parallel wurde das noch im Gefäßsystem der Maus vorhandene Blut entfernt, indem es durch eine Inzision im rechten Vorhof abfloss.

3.10.4 Gefäßentnahme

Nach der Fixierung wurde durch einen Hautschnitt das frühere Operationsgebiet am linken Hinterbein der Maus eröffnet und die ehemals denudierte A. femoralis freigelegt. Das Gefäß wurde dann zuerst am Übergang der A. femoralis zur A. iliaca und dann am Abgang der A.

profunda femoris herausgetrennt, in einer Petrischale mit PBS von Blutresten gereinigt und über Nacht in 2 % PFA bei 4°C inkubiert. Am Folgetag wurde ein 0,5 ml Reaktionsgefäß mit Tissue Tek befüllt die fixierte Arterie der Länge nach darin eingebettet und mit flüssigen Stickstoff (N₂) eingefroren. Die Lagerung fand bei -80°C statt.

Sollten später mit den Gefäßschnitten PCNA-Färbungen durchgeführt werden wurde die Gefäßentnahme dahingehend variiert, dass das Gefäß mit 0,9% Kochsalzlösung perfundiert wurde und sofort nach Entnahme in Tissue Tek eingebettet und eingefroren wurde.

3.11 Anfertigen und Färben von Gefäßschnitten

3.11.1 Anfertigen der Gefäßschnitte

Zum Schneiden der Gefäße diente ein Kryostat CM 1900 der Firma Leica. Die gefrorenen Gefäßblöcke wurden mit einer Zange vorsichtig aus dem Reaktionsgefäß gedrückt und dann mittels Tissue Tek auf einem Stempel aufgefroren. Der Stempel mit dem Gefäßblock wurde in den Kryostat eingespannt, dann konnte das Gefäß bei -20 °C in 7 µm dicke Schnitte verarbeitet werden. Jeweils drei Schnitte wurden auf einen beschichteten Objektträger (Super Frost® Plus; Menzel Gläser) aufgefroren. Die Lagerung der Schnitte auf den Objektträgern fand bei -20°C statt, falls Fluoreszenzfarbstoffe bei der Operation appliziert wurden bei -80 °C.

3.11.2 Immunhistochemie

Vor Beginn der Antikörper-Färbung wurden die Kryoschnitte 10 min bei 4°C mit Aceton fixiert. Um unspezifische Bindungsstellen zu blocken, folgte eine 10 minütige Inkubation mit 10% Goat Serum, dann wurde für eine Stunde mit Antikörpern gegen FoxO1 (Verdünnung 1:100, Cell Signaling, Beverly, MA) bzw. PE konjugiertem Smooth Muscle α-Aktin (Verdünnung 1:500, Sigma, Taufkirchen) inkubiert. Die Antikörperlösungen wurden in PBS mit 0,1% BSA angesetzt.

Nach zweimaligem Waschen mit PBS erfolgte eine 10 min Inkubation mit einem Alexa Fluor 488 gekoppelten Sekundärantikörper (Verdünnung 1:200, Molecular Probes, Leyden, Niederlande) und erneutes Waschen. Dann wurden die Gefäßschnitte mit Histomount Medium (Zymed/Invitrogen, Karlsruhe) mit DAPI (5 µg/ml, Linaris, Wertheim) eingedeckelt und am Fluoreszenzmikroskop ausgewertet.

3.11.3 Morphometrie der Gefäßschnitte

Zur quantitativen Analyse der Neointimaentwicklung infolge von Gefäßdenudation und -dehnung wurden pro Arterie jeweils fünf representative Objektträger des Gefäßverlaufs ausgewählt und jeweils ein Schnitt ausgewertet.

Um die einzelnen Gefäßschichten besser voneinander abgrenzen zu können, wurden die Gefäßschnitte vor der Ausmessung mit Hämatoxylin-Eosin angefärbt.

Eosinlösung

100ml	EosinY gelöst in Aqua dest. (10g/l)
10 ml	Phloxin gelöst in Aqua dest. (10g /l)
780 ml	95% Ethanol
4 ml	Eisessig

Die Kryoschnitte wurden zunächst für 10 min in 4% PFA fixiert, dann 15 min mit PBS rehydriert. Es folgte eine Inkubation der Schnitte für 6 min in Gills Hämatoxylin Lösung III (Meck, Darmstadt) und erneuter Fixierung für 1,5 min in Eisessig. Mit Wasser wurden die Schnitte 3 min gewaschen. Im nächsten Schritt färbte man die Schnitte 2 min mit Eosinlösung, fixierte erneut 2 x 2 min mit einer Mischung aus Alkohol und Eisessig und danach 3 min mit Isopropylalkohol. Eingedeckelt wurden die Schnitte mit Eindeckmedium (Histomount, Invitrogen) und Deckgläsern eingedeckelt.

Das Ausmessen der Gefäßschichten geschah histomorphometrisch mit dem Fotoprogramm SPOT Advanced (Version 4.6, Diagnostic Instruments Inc.) und einem an den Computer angeschlossenen Leica

Fluoreszenz-Mikroskop. Unter dem Mikroskop wurde der Gefäßschnitt bei einer 10fachen Vergrößerung eingestellt. Auf dem Bildschirm umfuhr man nun mit Hilfe des Fotoprogramms und dem Cursor zunächst das Lumen, dann die Lamina elastica interna und zum Schluss die Lamina elastica externa der Arterie. Das Programm berechnete die jeweils eingeschlossenen Flächen, aus denen sich wiederum die Dicke von Neointima und Media, sowie das für die Auswertung wichtige Verhältnis von Neointima zu Media berechnen ließen.

3.11.4 Immunhistochemischer Nachweis von proliferierenden Zellen

Für die Färbung von proliferierenden Zellen wurde das PCNA Staining Kit der Firma Zymed Laboratories Inc. genutzt.

Als Positivkontrolle diente Mäusedarm. Zur Negativkontrolle erfolgte die Inkubation der Schnitte ohne Primärantikörper.

Vor Beginn der Färbung wurden die Kryoschnitte 10 min bei 4°C mit Aceton fixiert. Um die Aktivität von endogenen Peroxidasen zu blockieren, wurden die Objektträger dann für 10 min in Methanol mit 3% H₂O₂ inkubiert. Anschließend wurde für 3 x 2 min mit PBS gewaschen. Danach wurden die Schnitte 10 min mit Blocking solution inkubiert, um unspezifische Bindungsstellen im Gewebe zu blockieren.

Als Primärantikörper diente ein Biotin-gekoppelter Maus α PCNA Antikörper. Mit diesem wurden die Schnitte 50 min in einer feuchten Kammer inkubiert, dann 3 x 2 Minuten in PBS gewaschen. Im Anschluß erfolgte eine 10 min Inkubation mit einem Streptavidin gekoppelten Sekundärantikörper und ein erneutes Waschen. Dann wurde die kurz vor Gebrauch frisch angesetzte DAB-Lösung (jeweils 1 Tropfen von Reagens 4A, 4B und 4C auf 1 ml mit dH₂O verdünnen) auf die Objektträger gegeben. Nach einer Inkubationszeit von 4 min wurde Hematoxilin auf die Schnitte getropft und für 1-2 min inkubiert. Anschließend wurde mit Leitungswasser gewaschen, dann die Schnitte in PBS inkubiert bis eine Blaufärbung erkennbar war (ca. 30 sek). Zum Abschluß wurden die Schnitte 3 x 2 Minuten in dH₂O gewaschen.

Die Auswertung erfolgte am Mikroskop. Zunächst wurde die Anzahl PCNA positiver Zellen unter Durchlicht in Neointima und Media bestimmt und

anschließend die Gesamtzellzahl durch Zählung aller Zellkerne. Zur Analyse wurde die Prozentzahl der PCNA-positiven und damit proliferierenden Zellen benutzt.

3.12 Durchflusszytometrie

Die zu untersuchenden Zellen wurden trypsinisiert und mit FCS-haltigem Medium resuspendiert und in 15 ml Greinerröhrchen aufgenommen. Über eine Zentrifugation von 5 min bei 1200 U/min wurden die Zellen pelletiert und in 5 ml 70%igem Methanol resuspendiert. Die Zellen konnten bis zum weiteren Gebrauch über mehrere Tage bei -20°C gelagert werden. Zur weiteren Aufarbeitung wurden die Zellen wieder abzentrifugiert und in 5ml PBS mit 1%BSA gespült. Nach erneuter Zentrifugation wurden die Zellen nun mit 300µl PBS (mit 1% BSA, 100 µg/ml DNase freie RNase, 10 µg/ml PI) resuspendiert und 1 Stunde bei Raumtemperatur inkubiert. Nachfolgend wurden die Proben auf 2-3 ml mit der gleichen Lösung (ohne RNase) verdünnt und über einen Filter in Facs-Röhrchen überführt. Die Proben wurden mit einem Hochgeschwindigkeits-Durchflusszytometer (EPICs Altra, Beckman Coulter, Miami, Florida, USA) auf ihren DNA-Gehalt gemessen.

3.13 Statistik

Die gezeigten Daten sind als Mittelwerte +/- des mittleren Standardfehlers dargestellt. Die statistische Analyse erfolgte mit dem Programm SigmaStat (Systat Software Inc.) mittels Student's t-test bei 2 Gruppen bzw. one-way ANOVA bei mehr als zwei Gruppen. Die Post-hoc Analysen wurden nach der Methode für multiple Vergleiche (Holm-Sidak) durchgeführt. Ergebnisse wurden als statistisch signifikant erachtet, wenn $P < 0,05$.

4. Ergebnisse

4.1 Der Einfluss der miRNA-prozessierenden Enzyme Dicer und Drosha auf die Funktion glatter Gefäßmuskelzellen

4.1.1 Regulation der Expression von Dicer und Drosha während der Atherosklerose und Restenose

Da es bisher keine Daten über die Expression von Dicer und Drosha in vaskuloproliferativen Erkrankungen gibt, wurde zu Beginn dieses Projektes ihre Expression während der Atherosklerose und Restenose *in vivo* untersucht. Um die Expression während der Restenose bestimmen zu können, wurden C57BL6/N Mäuse dilatiert, ihre Femoralarterien nach 10 und 21 Tagen entnommen und RNA isoliert. Im Vergleich zu gesunden Kontrollgefäßen zeigte sich, dass die restenotischen Gefäße sowohl nach 10 als auch 21 Tagen eine signifikante Runterregulation von Dicer und Drosha aufwiesen (Abb. 5A, B).

Zur Untersuchung der Atherosklerose wurden Aortenbögen von ApoE/LDLr^{-/-} Mäusen im Alter von 6 und 12 Monaten im Vergleich zu 2 Wochen alten ApoE/LDLr^{-/-} Mäusen extrahiert, RNA isoliert und die Expression von Dicer und Drosha in der real-time PCR analysiert. Auch während der Entwicklung und Etablierung der Atherosklerose waren beide untersuchten Enzyme deutlich herunterreguliert (Abb. 5C, D).

Dieses eindeutige Regulierungsmuster führt zu der Frage, ob Dicer und Drosha – und damit miRNAs im Allgemeinen – einen Einfluss auf die Entstehung vaskuloproliferativer Erkrankungen haben oder ob sie lediglich einen Surrogatparameter dieser Prozesse darstellen.

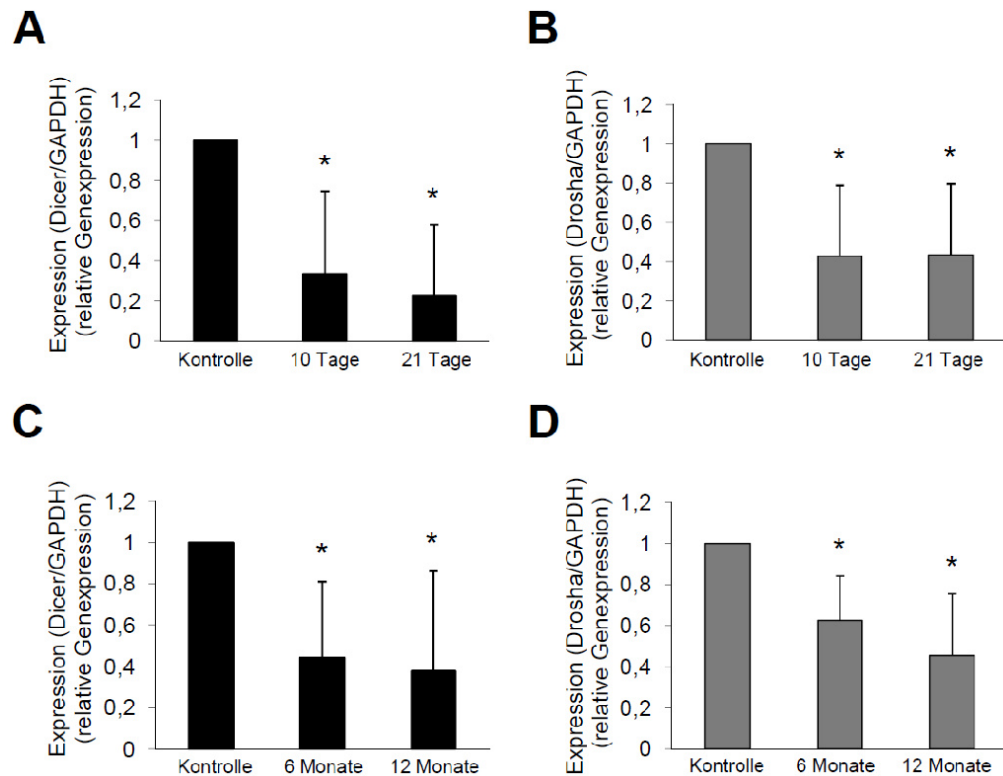


Abb. 5: Die Expression von Dicer und Drosha während der Restenose und Atherosklerose. A und B, mRNA Expression gemessen mittels real-time PCR von Dicer (A) und Drosha (B) in Femoralarterien 10 und 21 Tage nach Gefäßdilatation in Vergleich zur Expression in unverletzten Gefäßen (n = 6). C und D, mRNA-Expression gemessen mittels real-time PCR von Dicer (C) und Drosha (D) in Aortenbögen von ApoE/LDL^{-/-} Mäusen im Alter von 2 Wochen, 6 und 12 Monaten (n = 6).

4.1.2 Dicer und Drosha regulieren die Proliferation und Migration, aber nicht Apoptose in SMCs

Um die Rolle von miRNAs für die Schlüsselfunktionen von SMCs während der Entwicklung vaskuloproliferativer Erkrankungen untersuchen zu können, wurden Dicer und Drosha *in vitro* mittels spezifischer siRNA ausgeknockt.

Der Knockdown war erfolgreich auf mRNA- und Proteinebene (Abb. 6A, B). Einige Gruppen konnten bereits zeigen, dass ein Knockdown von Dicer zu einer globalen Reduktion der miRNA levels führt.⁸⁷ Hier wurde zusätzlich die Expression von miRNAs nach Knockdown von Drosha und auch einem kombinierten Knockdown beider Enzyme untersucht. Auch in diesen Fällen konnte eine deutliche Reduktion der Expression festgestellt werden, wie in Abbildung 6C exemplarisch anhand von miR-31 und let-7c gezeigt.

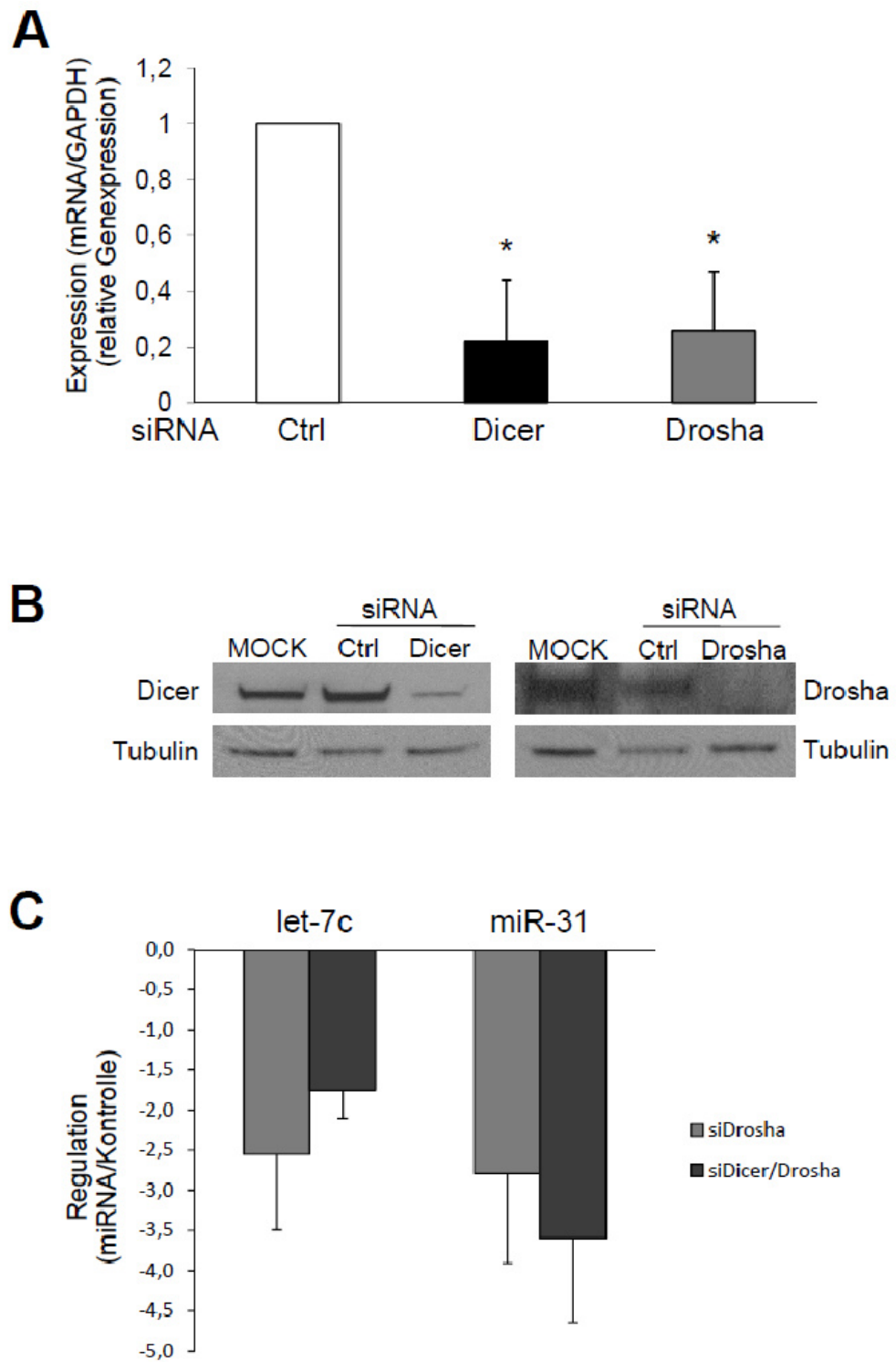


Abb. 6: A und B, Expression von Dicer und Drosha nach siRNA vermitteltem Knockdown in SMCs *in vitro*. A, Expression auf mRNA-Ebene detektiert mittels real-time PCR. B, Expression auf Proteinebene gemessen mittels Immunoblot. C, Regulation von miR-31 und let-7c nach siRNA vermitteltem Knockdown von Drosha und Dicer/Drosha.

Um die funktionelle Bedeutung eines miRNA Knockdowns für SMCs zu evaluieren wurden im Folgenden einige funktionelle Assay durchgeführt. Im Proliferationsassay zeigte sich deutlich, dass der Knockdown von sowohl Dicer als auch Drosha – und somit der Knockdown der miRNAs – zu einer signifikant verstärkten Proliferation auf bis zu 150% führt (Abb. 7A) und damit auch zu einer erhöhten Zellzahl (Abb. 7B). Um den Effekt des Knockdowns von Dicer und Drosha auf die Migration zu untersuchen wurde ein modifizierter Boydenchamber Assay mit 10% FCS als chemotaktischem Stimulus durchgeführt. Es zeigte sich, dass auch die Migration der SMCs signifikant erhöht war (Abb. 7C), während kein Effekt auf die Apoptoserate, nach Stimulation mit 0,5 M H₂O₂, messbar war (Abb. 7D).

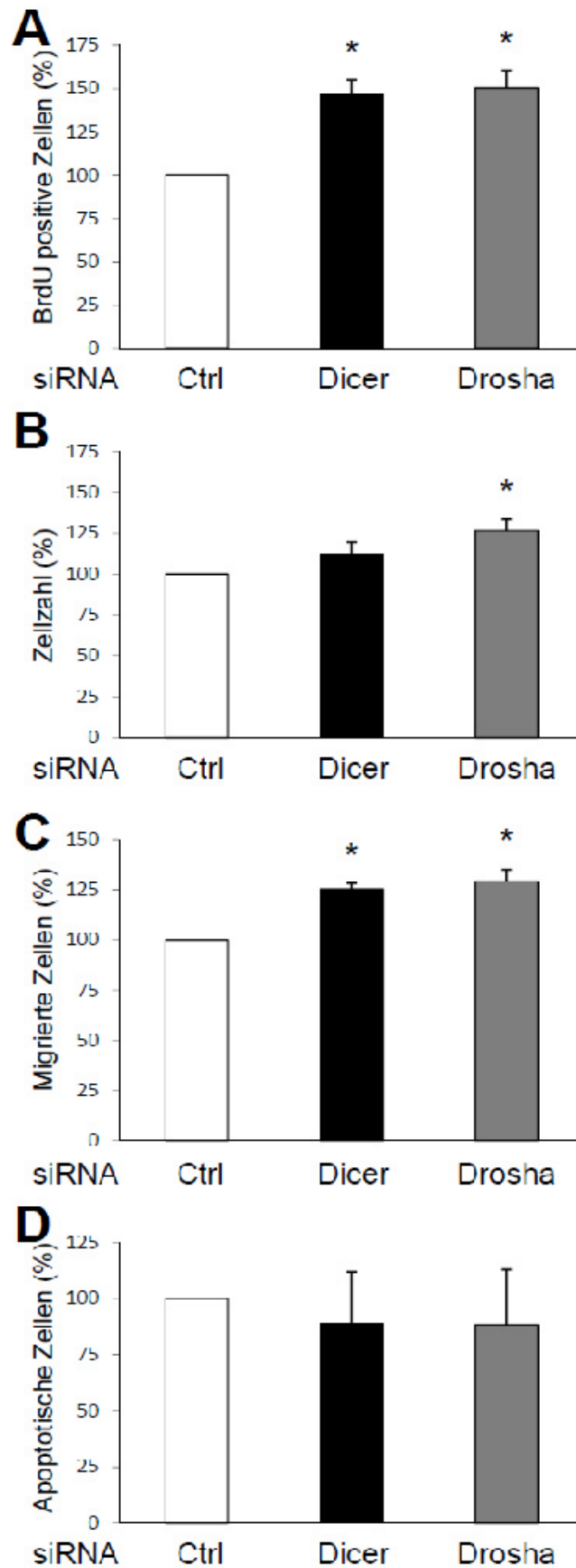


Abb. 7: Effekt des siRNA-vermittelten Knockdowns von Dicer und Drosha in SMCs auf Proliferation (A, BrdU-Inkorporation), Zellzahl (B, Wst-1-Metabolisierung), Migration (C, modifizierter Boydenchamber Assay) und Apoptose (D, Cell Death Detection Kit).

4.1.3 Herrunterregulation von Drosha führt zu einer verstärkten

Expression von Genen der Zellzyklusregulation

Im Folgenden sollte der Mechanismus der durch Knockdown von Dicer und Drosha gesteigerten Proliferation genauer untersucht werden. Um ihn zu analysieren wurde zunächst eine FACS Analyse von Propidiumiodid gefärbten SMCs durchgeführt. Der Knockdown resultierte in der FACS Analyse in einem verstärkten Eintritt der Zellen in die S- und G2/M-Phase (Abb. 8A, B). Um hierfür verantwortliche Gene zu identifizieren wurde nach Drosha Knockdown in einem PCR Array die Expression von 84 Genen des humanen Zellzyklus mittels real-time PCR determiniert (Abb. 8C).

Es zeigte sich, dass der Knockdown zu einer Hochregulation der Mehrzahl der Gene führte (61,9%) während nur 35,7% in ihrer Expression vermindert wurden und dies auch in deutlich geringerem Ausmaß. Figur 8C zeigt eine Übersicht aller Gene, die mindestens 1,3 fach reguliert waren. Unter diesen Genen befand sich CDK2, CDK6 (Cyklin-abhängige Kinasen 2 und 6) und SKP2 (S-phase Kinase-associated protein 2), ein essentielles Element der CDK2 S-Phase Synthetase. Demnach drei Gene, die für die Zellzyklusprogression von der G1-Phase an verantwortlich sind und somit möglicherweise für die verstärkte G0-G1-/S-Phase Progression der Zellen verantwortlich sein könnten. Das am stärksten hochregulierte Gen infolge des Drosha Knockdowns ist BCL-2 (B-cell lymphoma 2), ein anti-apoptotisches Gen, desweiteren war auch DDX11 (DEAD/H box polypeptide 11) etwa zweifach hochreguliert. DDX11 gehört zu den DEAD Box Proteinen, die in einer Reihe von zellulären Prozessen eine Rolle spielen. So sind sie u.a. wichtig für die Initiierung der Translation, das nukleäre und mitochondriale Splicing. Im Zellzyklus wirken sie positiv regulierend und sind durch ihre Helikase-Aktivität besonders für den Übergang der G2 zur M-Phase mitverantwortlich und wichtig während der S-Phase.⁸⁸ Deutlich verringert exprimiert infolge des Drosha Knockdowns waren die pro-proliferativ wirkenden Gene CCNT2 (Cyclin T2; zusammen mit der Cyklin-abhängigen Kinase 8 bildet CCNT2 eine Untereinheit des transkriptionellen Elongationsfaktors p-TEFb), CCNC (Cyclin C; interagiert mit der Cyklin-abhängigen Kinase 8 und induziert die Phosphorylierung einer Untereinheit der RNA polymerase II, besonders hohe Expression während der G1 Phase),

HERC5 (Hect Domain and RLD 5; wichtig während der G2-Phase bzw. dem Übergang zur M-Phase), CCNB1 (Cyclin B1; beteiligt an der Mitose, bildet mit p34 den maturation-promoting factor (MPF)), sowie die bekannten anti-proliferativ wirkenden Gene CDKN1A (Cyclin-dependent kinase inhibitor 1A, p21, Protein 21; Expression wird kontrolliert über p53, inhibiert die Aktivität von CDK2/CDK4-Komplexen und damit die Zellzyklusprogression während der G1-Phase) und TP53 (p53, Protein 53; reagiert auf Stresssignale mit der Induzierung von Zellzyklusarrest, Apoptose, Seneszenz, DNA Reparatur oder Änderungen im Metabolismus).

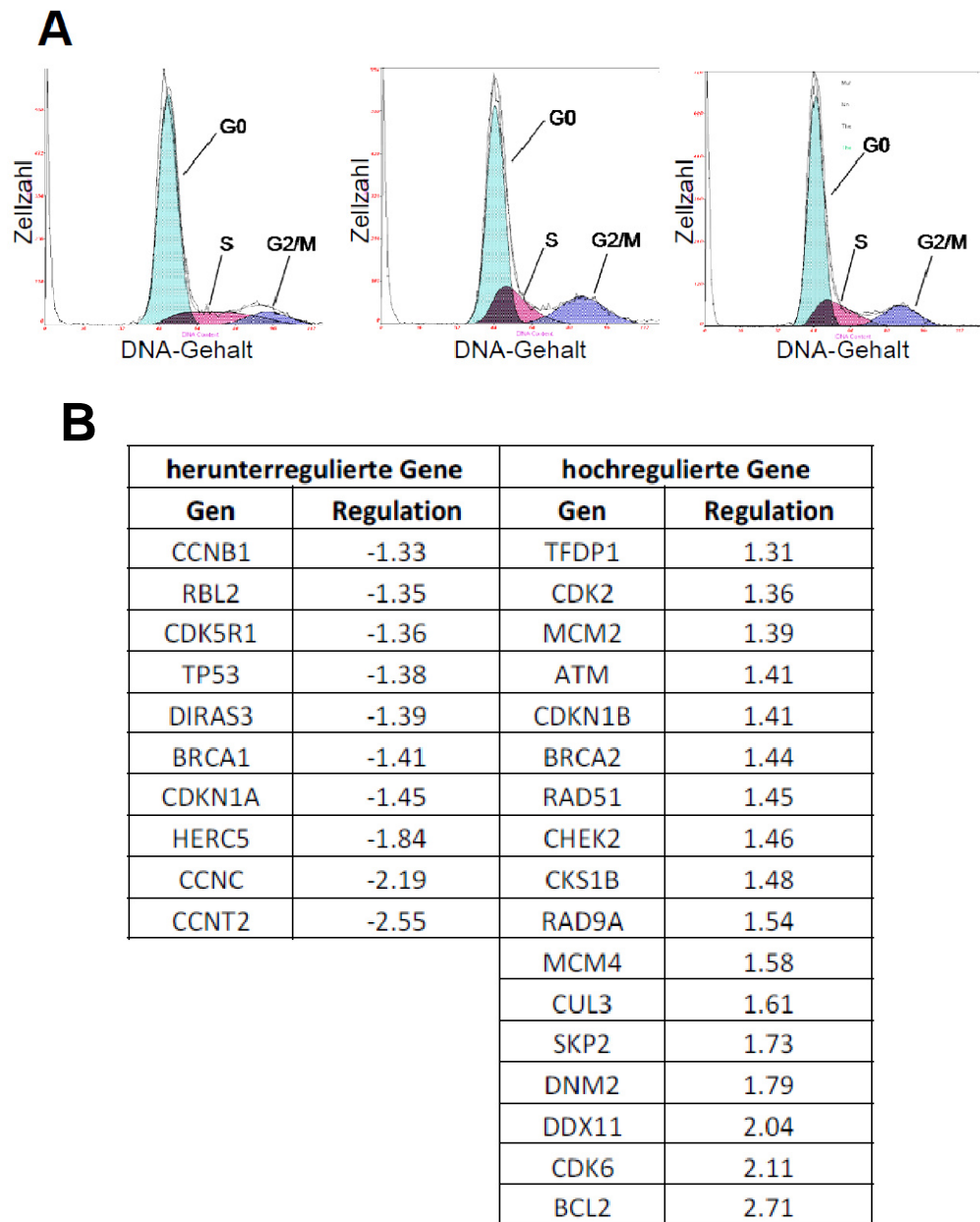


Abb. 8: A, Effekt eines siRNA vermitteltem Dicer bzw. Droscha Knockdown auf die Zellzyklusprogression, ermittelt durch FACS Analyse. C, Effekt eines siRNA-vermitteltem Droscha Knockdown auf die Expression von Genen der Zellzyklusmaschinerie.

4.1.4 Proliferative Stimuli führen zur reduzierten Expression von Dicer und Drosha

Um zu untersuchen, welche potentiellen Stimuli für das *in vivo* detektierte Expressionsprofil von Dicer und Drosha verantwortlich sein könnten, wurden die drei hauptsächlich während vaskuloproliferativer Erkrankungen vorkommenden Stimuli (proliferativ, inflammatorisch und apoptotisch) auf SMCs *in vitro* untersucht und die Expression von Dicer und Drosha mittels real-time PCR nach 12 und 24 Stunden quantifiziert.

Eine Stimulation mit 10% FCS führte hierbei zu einer signifikant reduzierten Expression von Drosha bereits nach 12 Stunden und beider Enzyme nach 24 Stunden (Abb. 9A). Um Apoptose in SMCs zu induzieren wurden diese mit 0,5 M H₂O₂ behandelt. Dies hatte keine Auswirkungen auf die Expression von Drosha, die Expression von Dicer dagegen war nach 12 Stunden tendenziell herunterreguliert, nach 24 Stunden erreichte sie aber wieder den Ausgangswert (Abb. 9B). Ein weiterer wichtiger Stimulus *in vivo* ist die Inflammation. *In vitro* wurde sie imitiert durch die kombinierte Gabe von TNF- α (20 ng/ μ l), INF- γ (20 ng/ μ l) und IL1- β (20 ng/ μ l). Diese Stimulation führte in SMCs zu einer erhöhten Expression von Dicer nach 12 und 24 Stunden. Drosha dagegen wurde geringer exprimiert nach 24 Stunden (Abb. 9C).

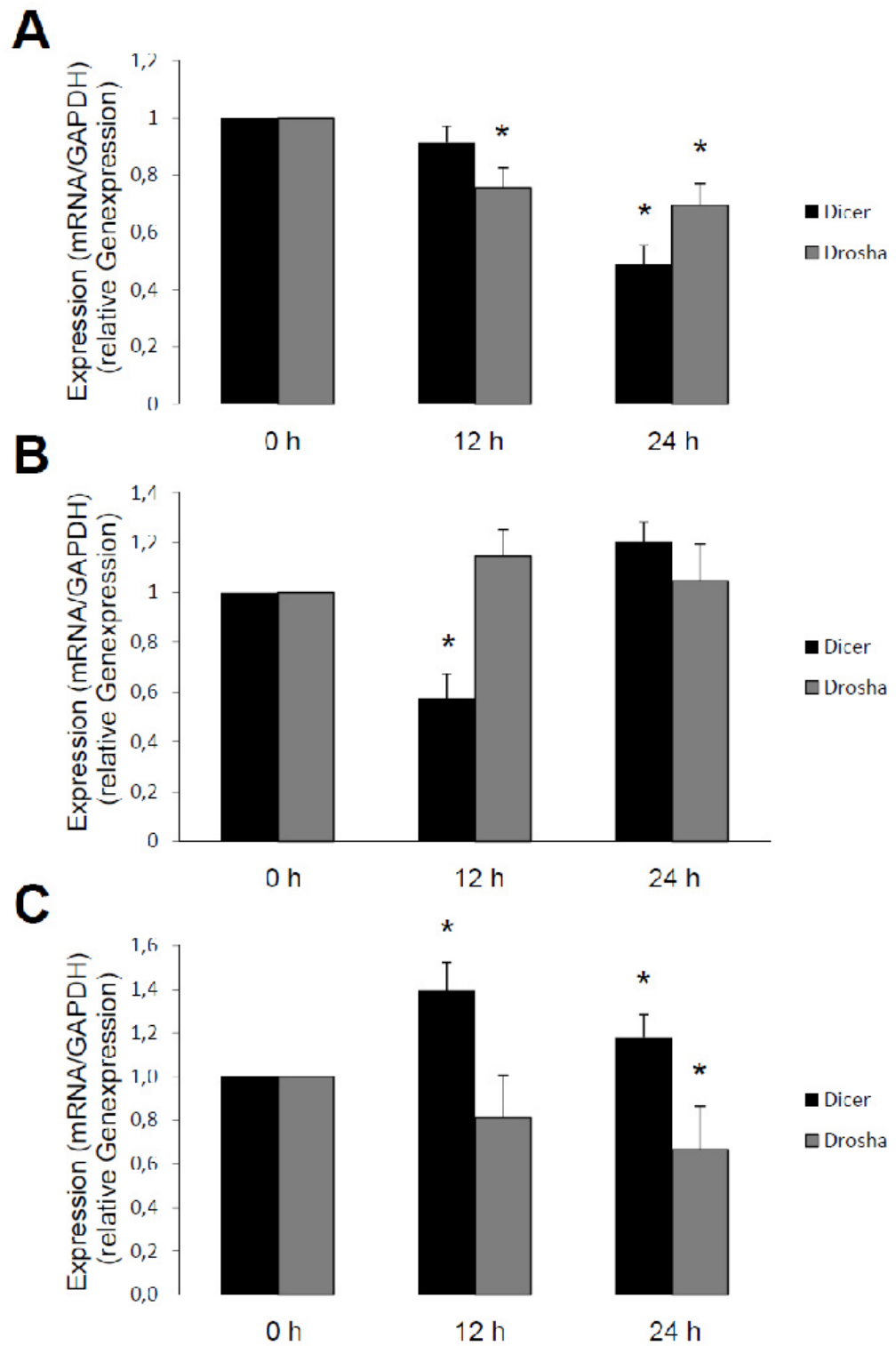


Abb. 9: Expression von Dicer und Drosha auf mRNA-Ebene in SMCs nach mitogener (A), apoptotischer (B) bzw. inflammatorischer (C) Stimulation, detektiert mittels real-time PCR.

4.1.5 Analyse der transkriptionellen Regulation der Dicer Expression

4.1.5.1 *In silico* Analyse der Promoterregion von Dicer

Um die *in vitro* und *in vivo* vorgefundene Herunterregulation von Dicer auf transkriptioneller Ebene zu untersuchen, wurde eine *in silico* Promoteranalyse durchgeführt.

Die Sequenz der Promoterregion wurde mit dem Programm Gene2Promoter (Genomatix) artenübergreifend aus der Datenbank NCBI aufbereitet. Mit Hilfe der Programme MatInspector und MatBase (Genomatix) konnten mögliche Bindungsstellen für Transkriptionsfaktoren identifiziert werden. Interessant sind besonders Gruppen von Transkriptionsfaktoren, sogenannte Module, die in ihrer Orientierung über die Arten konserviert sind. Bei diesen phylogenetisch konservierten Modulen steigt die Wahrscheinlichkeit, dass es sich um funktionelle Faktoren handeln könnte.

Abb. 10B zeigt die Promoterregion von Dicer im Menschen, Schimpansen, Maus, Ratte und Auerchse, sowie konservierte Transkriptionsfaktorenmodule. Aufgrund der deutlichen Konservierung dieser Module (rot bzw. grün umrandet) zwischen den Arten und der relativ großen Anzahl an Transkriptionsfaktorbindestellen, bestehend aus Bindungsregionen für die Forkhead Transkriptionsfaktoren (FKHD), Homeobox Transkriptionsfaktoren (HBOX), NK6 Homeobox Transkriptionsfaktoren (NKX6), Homeodomain Transkriptionsfaktoren (HOMF) und Retenoid X Rezeptor (RXRF) wurden diese Transkriptionsfaktoren einer Literaturrecherche unterzogen.

HBOX Transkriptionsfaktoren spielen bekannterweise eine wichtige Rolle während der Entwicklung bzw. Morphogenese. Daneben besitzen einige Mitglieder Schlüsselfunktionen in der Tumorentstehung und Metastasenbildung.⁸⁹ Ähnlich wirken auch die Mitglieder der HOM Familie in der Entwicklung von Organen und Gehirn, außerdem bei der Selbsterneuerung von undifferenzierten embryonischen Stammzellen.⁹⁰⁻⁹²

Die NKX Transkriptionsfaktoren kontrollieren verschiedene Entwicklungsprozesse von u.a. dem zentralen Nervensystem, dem Magen-Darm-Trakt und der Bauchspeicheldrüse.⁹³ Die RXR Familie der Transkriptionsfaktoren sind wie der Name sagt wichtig für den Retinolsäure

Signalweg, insgesamt regulieren sie direkt oder indirekt 532 Gene verschiedener Funktionen.⁹⁴

Auf der Basis dieser Recherche wurde der Forkhead Transkriptionsfaktor FoxO1 als wahrscheinlichster, Dicer-regulierender Transkriptionsfaktor identifiziert und in weiteren Analysen untersucht.

Die Familie der Forkhead Transkriptionsfaktoren reguliert in Abhängigkeit von übergeordneten Signaltransduktionskaskaden wie der PI3K/Akt oder der p42/p44MAPK die Zellzyklusprogression und hierüber die Proliferation, Migration und Apoptose vaskulärer Zellen.^{95, 96} Wachstumsfaktoren aktivieren den PI3K/Akt Signalweg, der zu einer Phosphorylierung und somit Inaktivierung von FoxO führt und den ansonsten FoxO-induzierten Zellzyklusstop aufhebt.⁹⁷ Die Bindung von FoxO an Promoterregionen ist demnach gesteuert durch Wachstumsfaktoren, zudem sind FoxOs in der Lage die Genexpression sowohl zu initiieren als auch zu inhibieren. Diese Daten würden das von uns vorgefundene Expressionschema von Dicer erklären können. Daher wurde nun im Folgenden untersucht, ob FoxO1 an die Promoterregion von Dicer bindet. Als Basis diente die humane Promotersequenz, deren Sequenz rund um die Bindungsregion von FoxO1 (fettgedruckt) in Abb. 10A dargestellt ist. Außerdem wurde zunächst überprüft, ob FoxO1 in SMCs exprimiert wird und wie dessen Aktivität reguliert wird.

A

GGAAGTGGGTGTTTGTATTTCCTCCCAATGCGGAGGCCCTGCACC
 ACTAACGCGAGGAAACGCGAGGCGAGTGGAAGGTACTTTAAAAAG
 GGGAGGGAGGTGCTCAGAGGGAAGCTAAGCT**TCCCGGAAACAA**
TTACGGCCACGTTACGGTCTGTGGGTGCCAGAAGGAGCAACAATG
 GAGGCAGTCGAATTCGAGAGCTCAGAGAGTCTGCCAACTTAG

B

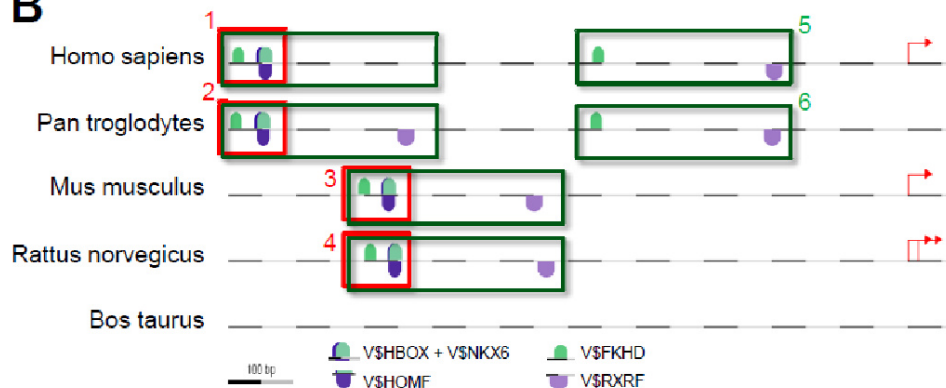


Abb. 10: A, Sequenzausschnitt der Promoterregion von Dicer, unterstrichen: Primer für die ChIP Analyse, fettgedruckt: FoxO1 Bindungsregion.
 B, Konservierte Promotermodule von Dicer

4.1.5.2 FoxO1 wird in SMCs exprimiert und über die PI3K reguliert

Da zur Expression von FoxO1 in Gefäßen wenig bekannt war, wurde zunächst in murinen Femoralarterien eine *in situ*-Färbung vorgenommen. In der Gefäßwand zeigte sich ein deutliches Signal für FoxO1, auch kolokalisiert mit Smooth Muscle α -Aktin (SMA) (Abb. 11A), was die Expression in SMCs beweist. Gefäßdilatation, die sich in einer signifikant verminderten Expression von Dicer äußerte, führte auch zu einer Phosphorylierung von FoxO1 und Akt (Abb. 11B). Da frühere Studien zeigten, dass eine Wachstumsfaktorabhängige Inaktivierung von FoxO1 über eine Phosphorylierung von Akt und Translokation von FoxO1 vom Zellkern ins Cytoplasma wirkt,⁹⁶ wurde im Folgenden überprüft, ob Serumstimulation von SMCs PI3K/Akt-abhängig in einer Phosphorylierung und nuklearem Export resultiert. Wie der Western Blot in Abb. 11C zeigt, kommt es durch die Serumstimulation von SMCs zu einer deutlichen Phosphorylierung von Akt und ebenso zu einer Phosphorylierung und somit Inaktivierung von FoxO1 auf Proteinebene, die durch spezifische Inhibitoren der PI3K (Ly294002, 50 μ mol/l; Wortmannin, 100 nmol/l) verhindert werden konnte. Die Immunofärbung in Abb. 11D zeigt anschaulich, dass die durch Stimulation mit Wachstumsfaktoren hervorgerufene Translokation von FoxO1 ins Cytoplasma durch Wortmannin inhibiert wurde. Die PI3K konnte daher als wichtiger Faktor der FoxO1 Aktivierung in SMCs bestätigt werden.

Für die folgenden Versuche wurde ein adenoviraler Vektor mit einer nicht phosphorylierbaren und somit nicht inaktivierbaren, konstitutiv aktiven Mutante von FoxO1 verwendet. Die Effizienz der Überexpression wurde in Abb. 11E anhand des parallel exprimierten GFP-Signals des bicistronischen Vektors determiniert.

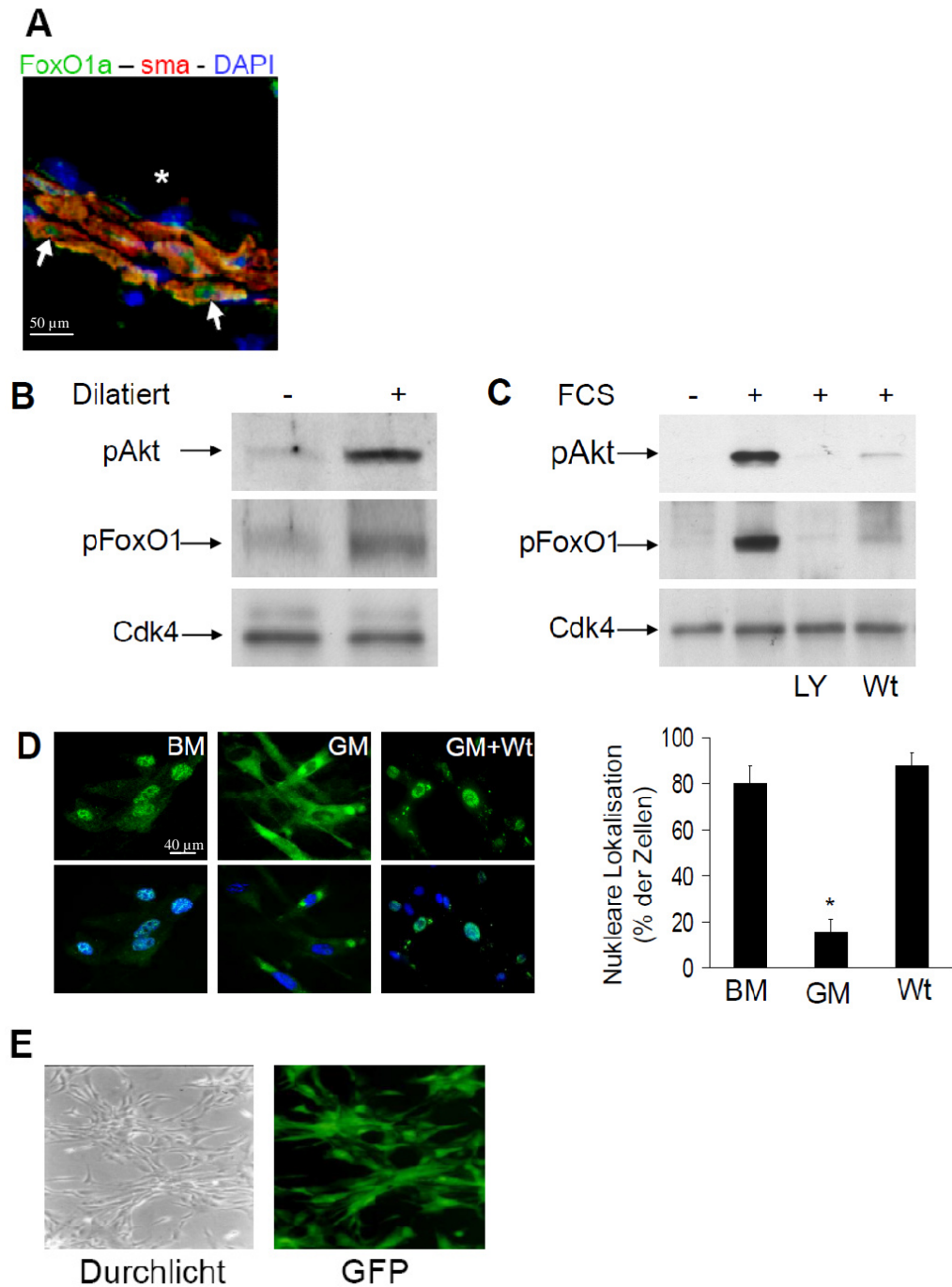


Abb. 11: FoxO1 Expression und Phosphorylierung *in vitro* und *in vivo*. A, Repräsentativer Ausschnitt eines Gefäßquerschnitts einer murinen Femoralarterie. Gefärbt wurde für FoxO1 (grün, Pfeil), Smooth Muscle α -Actin (rot) und DAPI (blau). *luminale Seite des Gefäßes. B, Immunoblot Analyse der Phosphorylierung von Akt und Foxo1 in murinen Femoralarterien 30 min nach Dilatation. CDK4 diente als Ladekontrolle. C, Lysate von SMCs unter basalen bzw. Wachstumsbedingungen wurden im Immunoblot analysiert und die Phosphorylierung von FoxO1 und Akt in der Ab- bzw. Anwesenheit der spezifischen Inhibitoren Ly294002 (Ly) und Wortmannin (Wt) analysiert. CDK4 diente als Ladekontrolle. D, Repräsentative Färbungen für FoxO1 (grün) und DAPI (blau) in SMCs unter basalen Bedingungen, Wachstumsbedingungen und Wachstumsbedingungen unter Zugabe von Wortmannin (Wt). FoxO1-positive Zellen wurden auf ihre Kernlokalisierung quantifiziert. E, SMCs wurden mit pFoxO1 transduziert und die Überexpression von FoxO1 anhand der Expression von GFP unter dem Fluoreszenzmikroskop detektiert.

4.1.5.3 FoxO1 hemmt die Proliferation von SMCs

Da die FoxO Transkriptionsfaktoren FoxO1a, FoxO3a und FoxO4 funktionell im Zusammenhang mit mitogenen Signalkaskaden stehen,^{95, 96} sollte eine Überexpression von FoxO1 einen Einfluss auf die Proliferation von SMCs zur Folge haben.

Um dies zu untersuchen wurde FoxO1 *in vitro* mittels eines adenoviralen Vektors überexprimiert und die Zellzahl und BrdU Inkorporation im Vergleich zur Transduktion mit einem Virusleervektor sowie einem lediglich GFP exprimierenden Virus analysiert. Besonders nach 48 Std. führte die FoxO1 Überexpression zu einer deutlich erniedrigten Zellzahl im Vergleich zu den Kontrollen (Abb. 12A) und auch die BrdU Inkorporation war signifikant vermindert. (Abb. 12B).

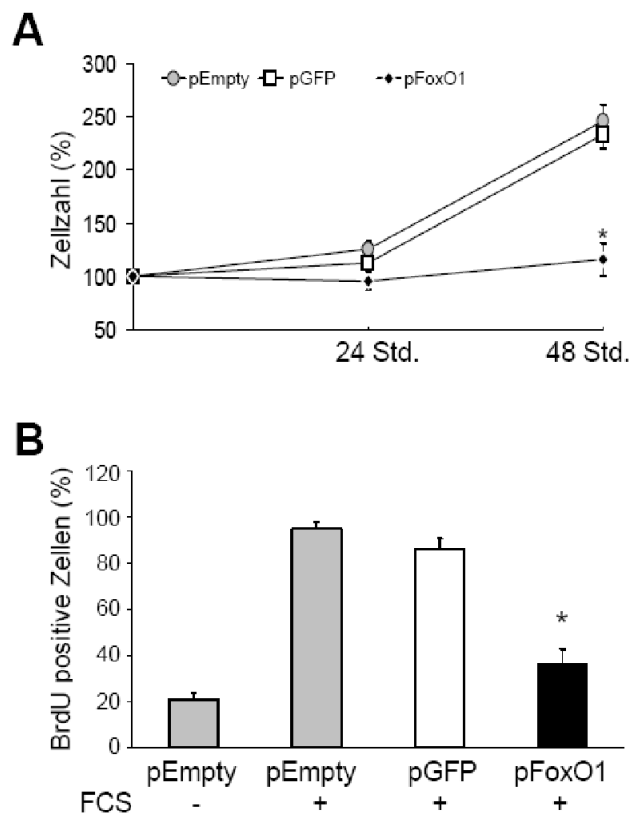


Abb. 12: Effekt der viralen Überexpression von FoxO1 in SMCs im Vergleich zur Transduktion mit einem Virusleervektor und einem GFP exprimierenden Virus auf die Zellzahl (A) und Proliferation (B).

4.1.5.4 Experimentelle Analyse der Promoterregion von Dicer

Mit Hilfe einer Chromatin Immunpräzipitation (ChIP) wurde nun die direkte Bindung von FoxO1 an die in Abb. 10B dargestellte Promoterregion geprüft.

Da FoxO1 Transkriptionsfaktoren unter serumfreien Bedingungen an ihre Promoterregionen binden, nach Stimulation durch Wachstumsfaktoren den Zellkern verlassen und im Cytoplasma degradiert werden (Abb. 11) (Forkhead Transcription Factor FoxO1a: A Central Player of Neotinitis Formation Through Modulation of Proliferation, Migration and Apoptosis, Sedding et al. Circulation Research – in revision), wurden SMCs *in vitro* 24 Std. mit Basalmedium vorbehandelt, um eine FoxO1 Bindung an die Promoterregionen zu erreichen. Eine Kondition verblieb bei Basalmedium, als zweite Kondition wurde ein Teil der Zellen 20 min mit Wachstumsmedium (inkl. 20% FCS) behandelt, dann parallel die Zellen, sowie Protein-Chromatin-Bindungen fixiert. Nach Aufschluss der Zellen wurde das Chromatin enzymatisch verdaut und die Proben mit einem spezifischen FoxO1 Antikörper und als Kontrolle IgG inkubiert. Ein Teil des hierfür eingesetzten Chromatins wurde als Input DNA für die spätere PCR zurückbehalten. Nach Aufreinigung des durch die Antikörperbindung isolierten Chromatins, sowie der Input DNA, wurde eine PCR mit den in Abb. 10A abgebildeten Primern durchgeführt und die Produkte auf ein Agarosegel aufgetragen (Abb. 13A).

Das PCR-Produkt der Input DNA als Kontrolle für die Anwesenheit der untersuchten Sequenz gibt unter basalen und Wachstumsbedingungen ein gutes Signal auf dem Agarosegel. Die schwachen Banden der IgG Kontrolle weisen auf einen geringen Grad an unspezifischer Antikörperbindung hin. Die Intensitäten der Banden der PCR Produkte nach FoxO1 Antikörperbindung entsprechen ungefähr denen der Input DNA, so dass Foxo1 als Transkriptionsfaktor, der an die untersuchte Sequenz in der Promoterregion von Dicer bindet, identifiziert werden konnte.

Um den direkten Einfluss von FoxO1 auf die Expression von Dicer *in vitro* zu verifizieren, wurde der Transkriptionsfaktor in SMCs ausgeknockt bzw. überexprimiert und die Auswirkungen auf die Dicer-Expression mittels real-time PCR untersucht.

Für den Knockdown wurden SMCs mit spezifischer siRNA gegen FoxO1 bzw. einer Kontroll-siRNA transfiziert und die Expression von Dicer auf

mRNA-Ebene nach 24 Stunden untersucht. Abb. 13B zeigt deutlich die relativ hohe Expression von Dicer unter serumfreien Bedingungen nach Transfektion mit Kontroll-siRNA und die Herunterregulation nach Stimulation mit FCS. Der Knockdown von FoxO1 führte zu einer ähnlich verminderten Expression wie infolge der FCS Stimulation trotz serumfreier Bedingungen.

Um FoxO1 überzuexprimieren, wurde eine nichtphosphorylierbare Mutante des FoxO1 benutzt. Vier Tage nach Virustransduktion von SMCs wurde mRNA isoliert und die Expression von Dicer determiniert (Abb. 13C). Unter Wachstumsbedingungen konnte die ohnehin relativ hohe Expression von Dicer durch die Überexpression von FoxO1 noch signifikant gesteigert werden. Und auch nach FCS Stimulation der SMCs führte die Überexpression zu einer signifikanten Hemmung der FCS-induzierten Herunterregulation von Dicer im Vergleich zur Kontrolle.

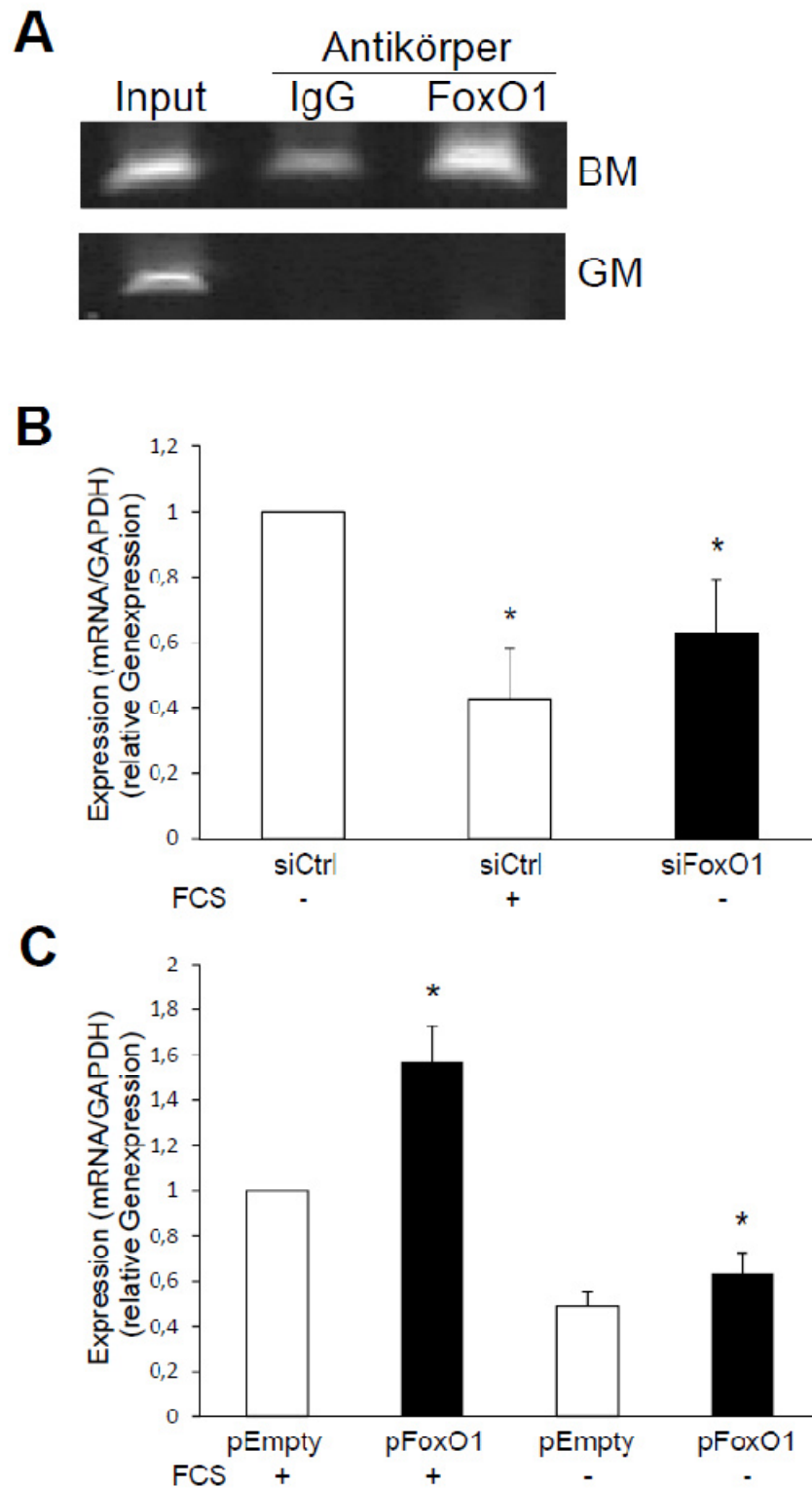


Abb. 13: A, Agarosegel der PCR-Produkte der Chromatin Immunpräzipitation von Zelllysaten aus SMCs vorbehandelt mit basalem bzw. Wachstumsmedium, durchgeführt mit Antikörpern gegen FoxO1 bzw. IgG, sowie das PCR-Produkt der Input DNA. B und C, Expression von Dicer auf mRNA-Ebene, gemessen mittels real-time PCR, nach Knockdown von FoxO1 (B) und Überexpression von FoxO1 (C) in SMCs.

4.1.6 Knockdown von Dicer und Drosha *in vivo* führt zu verstärkter Proliferation von SMCs und Neointimabildung

Um die *in vitro* erreichten Ergebnisse *in vivo* zu verifizieren, wurden Dicer und Drosha im Restenose-Mausmodell ausgeknockt.

Hierfür wurde der wirksame Knockdown von jeweils drei siRNAs gegen murines Dicer bzw. Drosha in mSMC *in vitro* analysiert (Abb. 14A, B) und die jeweils wirksamste siRNA (siDrosha 2, siDicer 3) für die *in vivo* Versuche in einer stabilisierten Modifikation benutzt. Diese beiden siRNAs wurden dann in einem Pluronic Gel nach Gefäßdilatation in der Maus um die freipräparierte Femoralarterie appliziert.

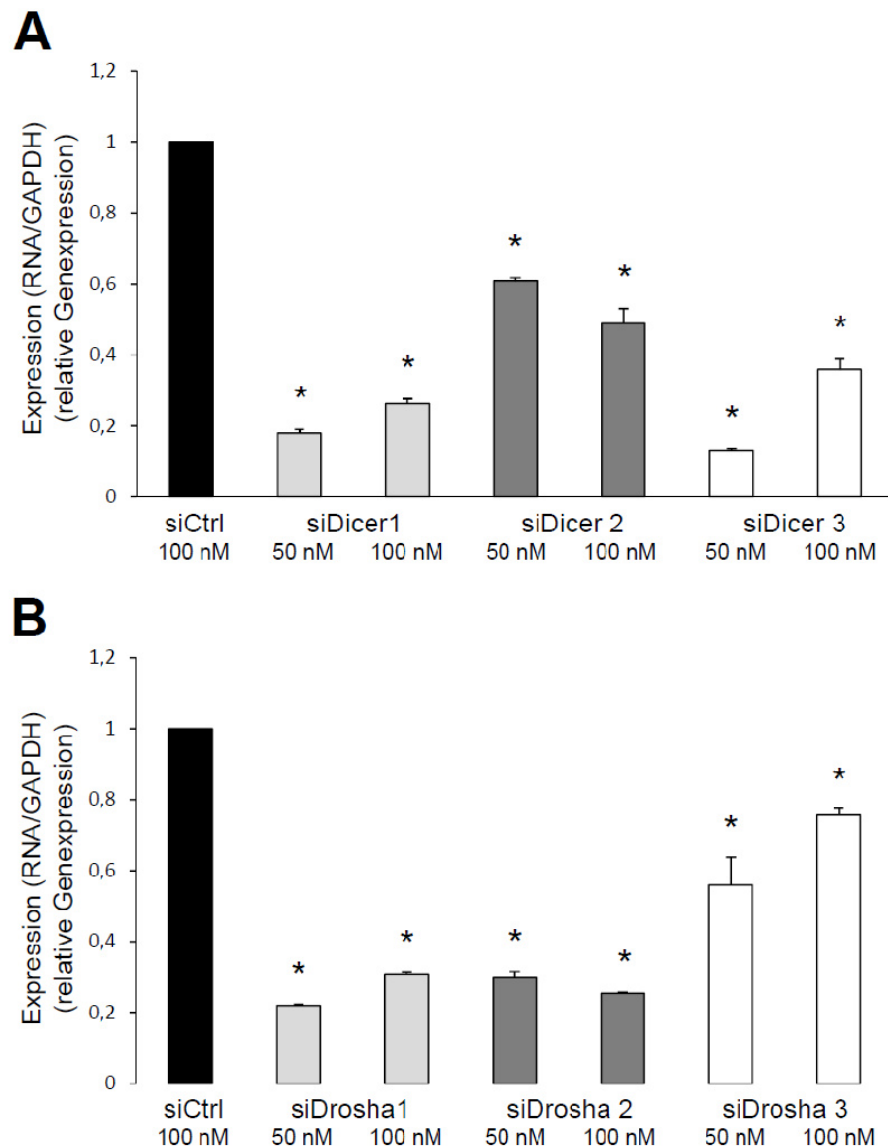


Abb. 14: A und B, real-time PCR Ergebnisse der mRNA-Expression von Dicer (A) und Drosha (B) nach siRNA vermitteltem Knockdown in murinen SMCs.

Dieser Transfektionsansatz erwies sich als sehr effektiv wie Abb. 15A zeigt. Hier wurden Gefäße in Vorversuchen mit cy3-markierter siRNA unter gleichen Bedingungen transfiziert und nach 24 Stunden entnommen. Eine Untersuchung der Schnitte dieser Gefäße unter dem Fluoreszenzmikroskop zeigte nach Optimierung des N/P-Verhältnisses der Transfektion und der siRNA-Konzentration eine sehr gute Effizienz der Transfektion. Der Großteil der Zellen der Gefäßwand wies ein cy3-Signal durch die siRNA auf.

Im endgültigen Versuch wurden jeweils 10 µg siRNA gegen Dicer und Drosha mit einem N/P-Verhältnis von 10 nach Gefäßdilatation im Gel appliziert und die Gefäße nach 21 Tagen wieder entnommen. Die morphometrische Analyse zeigte, dass das Neointima/Media-Verhältnis infolge des Knockdowns deutlich erhöht ist (Abb. 15B) im Vergleich zur Behandlung mit einer Kontroll-siRNA oder einer reinen Dilatation ohne zusätzliche Behandlung. Zusätzlich wurde der Anteil an proliferierenden Zellen im Bereich der Neointima und Media mittels PCNA Färbung bestimmt. Auch hier wiesen die Gefäße nach Knockdown von Dicer und Drosha einen deutlich erhöhten Anteil an proliferierenden Zellen auf (Abb. 15C).

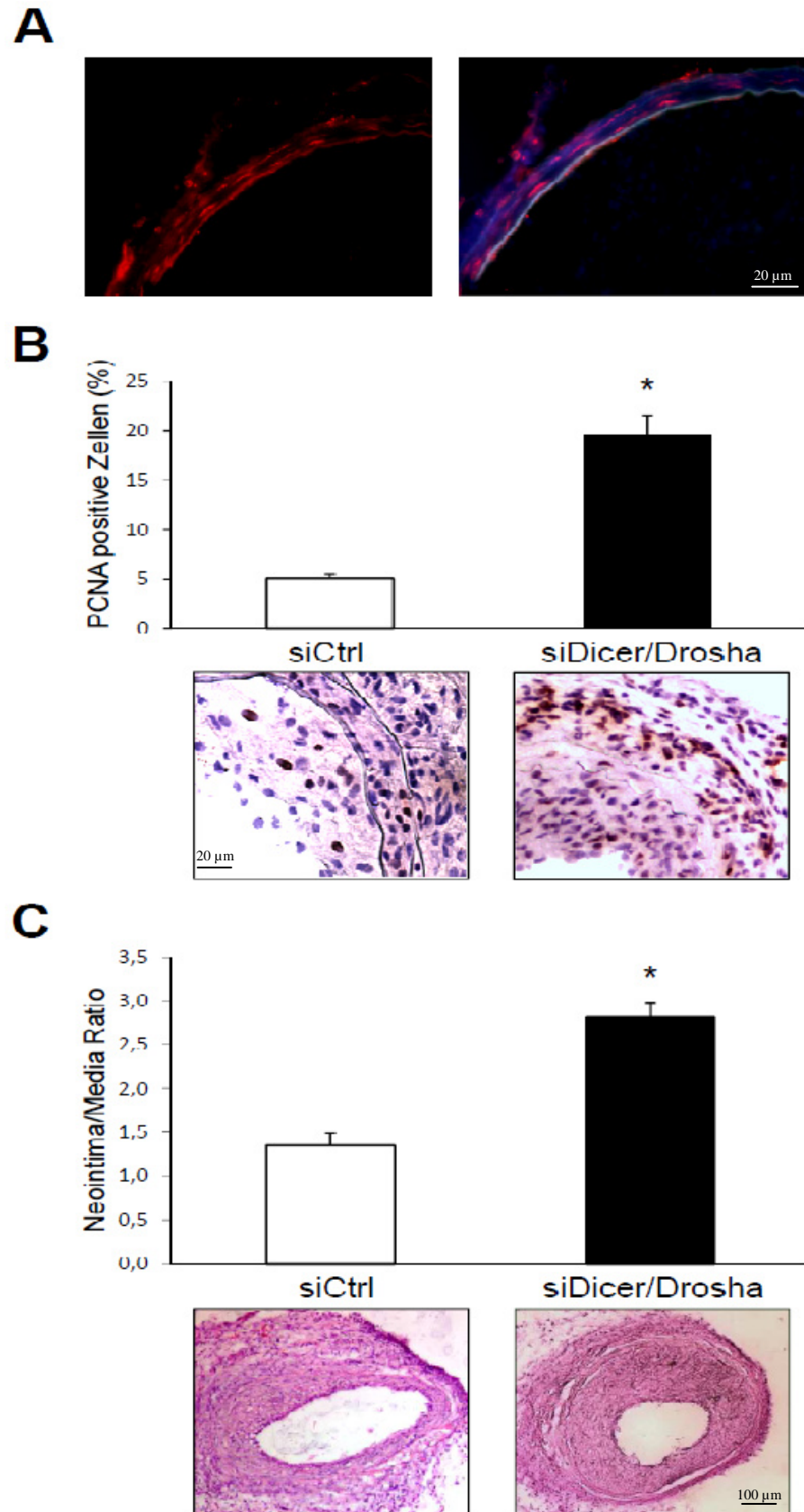


Abb. 15: A, Gefäßquerschnitte von murinen Femoralarterien 24 Stunden nach Transfektion mit mit cy3-gelabelter siRNA, rot: siRNA, blau: DAPI Kernfärbung. B, Anteil an PCNA positiven Zellen in Gefäßen, die mit siCtrl bzw. siDicer/Drosha transfiziert wurden, 21 Tagen nach Gefäßdilatation (n = 5). D, Neointima/Media Ratio von Gefäßen mit siCtrl bzw. siDicer/Drosha transfiziert, 21 Tagen nach Gefäßdilatation (n = 5).

4.2 Einfluss von miRNAs auf vaskuloproliferierende Erkrankungen

4.2.1 Die miRNA-Expression während der Atherosklerose und Restenose

Da zur Expression von miRNAs während vaskuloproliferierender Erkrankungen bisher noch nichts bekannt ist, wurde zunächst die Expression während der Atherosklerose und Restenose im Mausmodell gescreent.

Um die Expression während der Restenose bestimmen zu können, wurden Femoralarterien von C57BL6/N Mäuse dilatiert, nach 10 und 21 Tagen entnommen und miRNA isoliert. Als Kontrolle wurde miRNA aus gesunden Kontrollgefäßen isoliert.

Zur Untersuchung der miRNA Expression während der Entwicklung der Atherosklerose wurden Aortenbögen von ApoE/LDLr^{-/-} Mäusen im Alter von 6 und 12 Monaten entnommen, miRNA isoliert und die Expression von miRNAs im Vergleich zu Aortenbögen von 2 Wochen alten ApoE/LDLr^{-/-} Mäusen determiniert.

Das Screening ergab, dass die Mehrheit der bekannten miRNAs während der Atherosklerose und Restenose reguliert wurden. Während der Restenose sind nach 10 Tagen etwa 30% hoch- als auch herunterreguliert. Nach 21 Tagen fällt auf, dass über 60% der miRNAs verstärkt exprimiert wurden, während nur 11,6% nicht reguliert waren (Abb. 16A). Abb. 17A zeigt eine Übersicht über mindestens 5fach regulierte miRNAs 10 bzw. 21 Tage nach Gefäßverletzung, sowie einzeln ausgewählte miRNAs, die während der Atherosklerose deutlich reguliert wurden oder in der Literatur bereits im Zusammenhang mit proliferierenden oder inflammatorischen Prozessen beschrieben wurden. Alle dick gedruckten miRNAs der Liste wurden mittels real-time PCR validiert (Daten nicht gezeigt).

Während des betrachteten Verlaufs der Atherosklerose fand ebenfalls eine Regulation der miRNAs statt, die im Verlauf relativ konstant war. So waren um die 20% der miRNAs hochreguliert, ca. 35% herunterreguliert und ca. 45% der miRNAs waren in ihrer Expression nicht beeinflusst (Abb. 16B). Abb. 17B zeigt entsprechend eine Übersicht über mindestens 5fach regulierte miRNAs während der Atherosklerose, sowie einzeln ausgewählte miRNAs, die während der Restenose deutlich reguliert wurden oder die in der Literatur bereits im Zusammenhang mit proliferierenden oder inflammatorischen Prozessen

beschrieben wurden. Die miRNAs, deren Expression während der Atherosklerose mittels real-time PCR validiert wurden sind dick gedruckt (Daten nicht gezeigt).

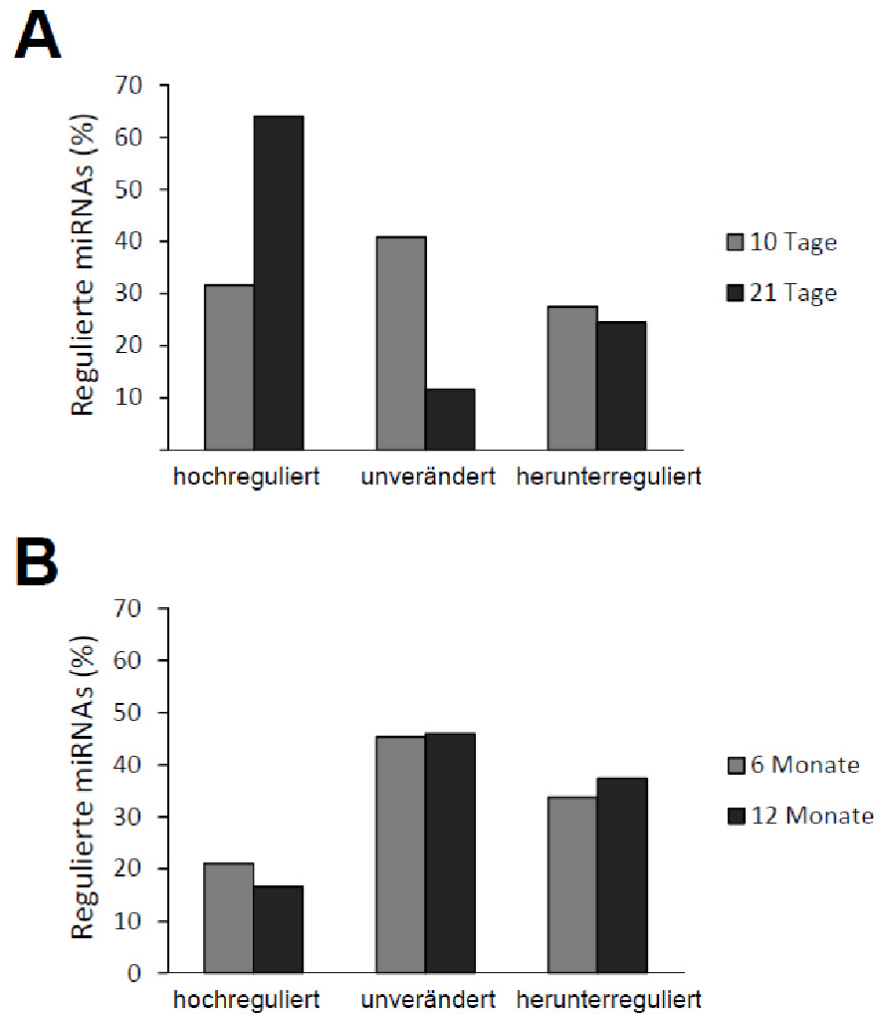


Abb. 16: Übersicht über den Anteil regulierter miRNAs während der Restenose (A) und Atherosklerose (B)

A

miRNA	Regulation nach 10 Tagen	Regulation nach 21 Tagen	miRNA	Regulation nach 10 Tagen	Regulation nach 21 Tagen
mmu-miR-15a	7,51	8,18	mmu-miR-292-5p	4,93	5,68
mmu-miR-31	7,28	7,70	mmu-miR-691	4,91	6,32
mmu-miR-342-3p	7,19	6,99	mmu-miR-532-5p	4,89	6,33
mmu-miR-671-5p	6,79	8,02	mmu-miR-181b	4,87	6,02
mmu-miR-19b	6,75	6,29	mmu-miR-188-5p	4,87	5,69
mmu-miR-299*	6,66	6,22	mmu-miR-18a	4,80	5,54
mmu-miR-494	6,62	6,00	mmu-miR-34c*	4,79	5,97
mmu-miR-495	6,52	5,86	mmu-miR-466f-5p	4,78	6,22
mmu-miR-148a	6,48	7,52	mmu-miR-125a-3p	4,76	5,93
mmu-miR-411	6,47	6,27	mmu-miR-327	4,76	5,68
mmu-miR-674*	6,41	6,06	mmu-miR-140	4,75	5,60
mmu-miR-154	6,26	6,40	mmu-miR-130b	4,56	5,68
mmu-miR-224	6,22	6,39	mmu-miR-696	4,55	5,37
mmu-miR-541	6,20	4,39	mmu-miR-421	4,49	5,40
mmu-miR-485*	6,14	6,00	mmu-let-7f*	4,48	5,61
mmu-miR-433	6,13	5,88	mmu-miR-324-3p	4,46	5,31
mmu-miR-324-5p	6,11	6,14	mmu-miR-290-3p	4,40	5,33
mmu-miR-335-5p	6,05	6,23	mmu-miR-210	4,37	5,52
mmu-miR-24-2*	6,03	6,84	mmu-miR-770-3p	4,36	5,88
mmu-miR-680	5,98	6,90	mmu-miR-466h	4,35	5,92
mmu-miR-298	5,96	6,21	mmu-miR-181d	4,29	5,04
mmu-miR-106a	5,82	5,60	mmu-miR-451	4,19	2,85
mmu-miR-34b-3p	5,75	5,63	mmu-miR-207	4,08	5,89
mmu-miR-374	5,74	5,66	mmu-miR-146a	3,11	3,35
mmu-miR-139-5p	5,67	6,27	mmu-miR-720	1,69	1,49
mmu-miR-300	5,65	5,49	mmu-miR-206	1,45	3,60
mmu-miR-411*	5,62	5,76	mmu-miR-16	0,88	0,67
mmu-miR-376b	5,62	5,61	mmu-miR-92a	0,63	0,06
mmu-miR-340-5p	5,58	5,39	mmu-miR-92b	0,16	-0,29
mmu-miR-706	5,56	5,70	mmu-let-7g*	0,00	5,33
mmu-miR-714	5,54	7,38	mmu-miR-182	0,00	5,04
mmu-miR-322	5,51	6,03	mmu-miR-187	0,00	5,16
mmu-miR-467a*	5,45	6,54	mmu-miR-485	0,00	5,45
mmu-miR-297a	5,41	4,48	mmu-miR-672	0,00	5,97
mmu-miR-197	5,37	4,28	mmu-miR-678	0,00	5,79
mmu-miR-20b	5,36	5,66	mmu-miR-712	0,00	5,30
mmu-miR-134	5,36	6,32	mmu-miR-877	0,00	5,36
mmu-miR-710	5,26	6,25	mmu-miR-23a	-0,10	0,05
mmu-miR-148b	5,17	4,77	mmu-miR-145	-0,89	-1,87
mmu-miR-101b	5,13	5,50	mmu-miR-143	-1,91	-2,39

4. Ergebnisse

mmu-miR-218	5,08	4,46	mmu-miR-184	-2,03	-8,42
mmu-miR-301a	5,06	4,31	mmu-miR-1	-3,73	0,12
mmu-miR-196b	5,00	4,67	mmu-miR-712*	-5,22	0,00
mmu-miR-149	5,00	5,25	mmu-miR-193	-5,41	0,09
mmu-miR-29b	4,95	5,48	mmu-miR-193b	-5,45	0,22

B

miRNA	Regulation nach 6 Monaten	Regulation nach 12 Monaten	miRNA	Regulation nach 6 Monaten	Regulation nach 12 Monaten
mmu-miR-466f-3p	5,09	1,82	mmu-miR-744	-0,54	-6,08
mmu-miR-146a	3,39	1,10	mmu-let-7f	-0,57	-2,58
mmu-miR-29b	2,89	-6,35	mmu-miR-28	-0,61	-6,46
mmu-miR-21	2,54	-3,04	mmu-let-7d*	-0,63	-6,98
mmu-miR-34a	1,52	-6,46	mmu-miR-30e	-0,66	-6,78
mmu-miR-207	1,51	-5,82	mmu-miR-130a	-0,69	-6,72
mmu-miR-720	1,43	3,45	mmu-miR-106a	-0,79	-4,69
mmu-miR-323-5p	1,14	-6,42	mmu-miR-455	-0,82	-7,99
mmu-miR-15a*	1,06	-5,59	mmu-miR-31	-0,86	0,27
mmu-miR-122	0,86	-8,17	mmu-miR-100	-0,92	-7,35
mmu-miR-494	0,81	-5,24	mmu-miR-92a	-0,94	0,33
mmu-miR-714	0,78	-6,20	mmu-miR-93	-0,94	-5,14
mmu-miR-451	0,58	-1,63	mmu-miR-127	-1,28	-6,89
mmu-miR-129-5p	0,49	-5,25	mmu-miR-145*	-1,33	-6,71
mmu-miR-501-3p	0,44	-5,89	mmu-miR-1	-1,38	-10,32
mmu-miR-16*	0,41	-5,82	mmu-miR-224	-1,67	-7,30
mmu-miR-485	0,40	-4,21	mmu-miR-10a	-1,75	-7,24
mmu-miR-140	0,40	-6,31	mmu-miR-801	-1,88	-5,86
mmu-miR-23a	0,34	-0,12	mmu-miR-379	-1,90	-6,84
mmu-miR-341	0,33	-5,46	mmu-miR-10b	-2,37	-5,95
mmu-miR-346	0,32	-6,02	mmu-miR-148a	-2,72	-6,48
mmu-miR-203	0,21	-5,78	mmu-miR-541	-3,98	0,00
mmu-miR-331-3p	0,20	-5,66	mmu-miR-877	-5,04	0,00
mmu-miR-421	0,19	-5,81	mmu-miR-431	-5,05	0,00
mmu-miR-143	0,18	-0,49	mmu-miR-376b	-5,14	4,17
mmu-miR-145	0,00	0,29	mmu-miR-324-3p	-5,21	0,00
mmu-miR-206	-0,07	-6,30	mmu-miR-30e*	-5,37	0,00
mmu-miR-486	-0,09	-6,34	mmu-miR-495	-5,47	0,00
mmu-miR-150	-0,10	-6,32	mmu-miR-872	-5,49	4,98
mmu-miR-125a-3p	-0,11	-5,51	mmu-miR-290-5p	-5,56	0,00
mmu-miR-16	-0,16	0,14	mmu-miR-154	-5,60	0,00
mmu-let-7b*	-0,22	-6,65	mmu-miR-376b*	-5,65	0,00
mmu-let-7c	-0,24	-0,53	mmu-miR-335-5p	-5,67	0,00
mmu-miR-652	-0,28	-6,52	mmu-miR-134	-5,80	0,00
mmu-miR-20a	-0,28	-6,10	mmu-miR-322	-5,90	0,00
mmu-miR-92b	-0,48	1,31	mmu-miR-676	-6,32	0,00
mmu-miR-15a	-0,50	-6,59	mmu-miR-351	-6,71	0,00
mmu-miR-193	-0,51	-5,96	mmu-miR-322*	-7,54	0,00

Abb. 17: Übersicht über mindestens 5fach regulierte miRNAs während der Restenose (A) und Atherosklerose (B) sowie jeweils einzeln ausgewählte weitere miRNAs

Da in den Experimenten zur Untersuchung der Expression von miRNAs während der Atherosklerose und Restenose jeweils die Expression im gesamten Gefäß untersucht wurde, blieb die Frage offen, welcher Zelltyp für die jeweilige miRNA Expression verantwortlich sein könnte. Die hauptsächlich in den Gefäßen vorkommenden Zelltypen sind Monozyten/Makrophagen, SMCs und ECs. Daher wurde aus diesen jeweiligen isolierten primären Zellen *in vitro* miRNA isoliert und ein Screening der miRNA Expression im Ruhezustand mittels Microarray durchgeführt (Abb. 18).

Da letztendlich die spezifische Expression von miRNA in humanen Zellen für spätere diagnostische oder therapeutische Ansätze von Bedeutung ist, wurden hierfür humane primäre Zellen ausgewählt, und mit den Expressionsdaten während der Atherosklerose und Restenose aus der Maus korreliert.

Die Arraydaten in Abb. 18 zeigen deutlich, dass viele miRNAs sich in ihrer Expression von Zelltyp zu Zelltyp unterscheiden. Insgesamt weisen SMCs und ECs eher überschneidende Expressionsprofile auf im Vergleich zur Expression in Monozyten/Makrophagen, wie man am Beispiel der let-7 Familie sehen kann.

Doch wie miR-98 oder miR-126 gibt es auch miRNAs, die fast ausschließlich in ECs vorkommen, oder in SMCs wie miR-214 und miR-199a-3p. Im Kontext der Entstehung vaskuloproliferativer Erkrankungen und dem Ziel, selektiv die Funktion von SMCs beeinflussen zu können, wurden im Folgenden bevorzugt miRNAs untersucht, deren Expression für SMCs spezifisch ist und die gleichzeitig während der Atherosklerose und Restenose reguliert werden.

	Monozyten/ Makrophagen	SMC	EC
miRNA	Mean	Mean	Mean
hsa-let-7a	7.768	29.261	29.759
hsa-miR-21	552	26.624	32.665
hsa-let-7c	1.681	25.025	25.680
hsa-let-7f	6.800	24.440	25.236
hsa-let-7d	4.368	21.328	24.001
hsa-let-7i	1.130	14.030	6.948
hsa-let-7e	445	13.815	21.897
hsa-let-7b	3.549	11.830	14.599
hsa-miR-26a	2.927	9.389	6.120
hsa-miR-199a-3p	471	9.171	15
hsa-miR-125b	146	8.308	3.123
hsa-miR-23a	1.281	6.750	9.437
hsa-miR-214	102	5.107	33
hsa-miR-31	87	3.974	872
hsa-miR-923	1.187	3.776	1.522
hsa-miR-221	352	3.646	4.541
hsa-miR-222	450	3.597	3.453
hsa-miR-155	469	995	3.444
hsa-miR-16	1.331	661	481
hsa-miR-98	136	454	3.083
hsa-miR-92a	2.505	451	952
hsa-miR-34c-3p	1.507	450	185
hsa-miR-25	268	442	885
hsa-miR-186*	791	378	295
hsa-miR-20a	263	357	1.025
hsa-miR-768-5p	1.482	357	187
hsa-miR-106a	275	250	799
hsa-miR-146a	227	138	1.029
hsa-miR-126	237	42	22.502
hsa-miR-145	105	378	29
hsa-miR-92b	211	163	271
hsa-miR-494	-	162	62

Abb. 18: Ausgewählte Übersicht über die miRNA Expression in humanen Monocyten/Makrophagen, SMCs und ECs.

4.2.2 Proliferative, apoptotische und inflammatorische Stimuli und ihre Wirkung auf die miRNA Expression in SMCs

Proliferative, apoptotische und inflammatorische Stimuli zählen zu den bedeutendsten Einflüssen, die während vaskuloproliferativer Erkrankungen auf SMCs wirken. Daher sollte nun untersucht werden, inwiefern diese Stimuli auf die Expression einzelner miRNAs wirken, die während der Atherosklerose und Restenose deutlich reguliert waren. Untersucht wurden hier einige miRNAs, deren Regulation *in vivo* in der real-time PCR bestätigt werden konnten.

Mitogene Stimulation *in vitro* wurde erreicht durch Zugabe von 10% FCS zum Zellkulturmedium, apoptotische Reize wurden mittels 0,5 M H₂O₂ vermittelt und Inflammation durch Zugabe von jeweils 20 ng/ ml TNF- α , IL-1 β und INF- γ .

Auffällig ist, dass miR-31, die während der Restenose *in vivo* 7-8fach hochreguliert war, keine Expressionsveränderungen nach mitogener oder apoptotischer Stimulation aufweist (Abb. 19A, B). Auch miR-106a zeigt keinerlei Veränderungen der Expression nach mitogener und apoptotischer Behandlung der SMCs (Abb. 19A, B), dabei weist diese miRNA im Mausmodell der Atherosklerose und Restenose ein interessantes und gegenläufiges Expressionsmuster auf. So ist miR-106a nach 12 Monaten in ApoE/LDL^{-/-} Mäusen fast 5fach weniger exprimiert (Abb. 17B), während der Restenose dagegen 5fach hochreguliert (Abb. 17A). MiR-92a gehört zur miR-17~92 Familie, die in einigen Tumoren als hochreguliert vorbeschrieben ist^{98, 99} und deren Mitglieder anti-angiogenische Proteine targeten.¹⁰⁰ Daher wurde diese miRNA hier weiter untersucht, obwohl keine auffällige Regulation während der Atherosklerose und Restenose stattfand (Abb. 17A, B). Apoptotische Stimulation der SMCs führte zu einer signifikant erhöhten Expression von mir-92a (Abb. 19B) während die Zugabe von Wachstumsfaktoren keine deutliche Veränderung der Expression hervorrufen konnte (Abb. 19A).

Ein dagegen sehr interessantes Expressionsmuster im pathogenen Mausmodell weist dagegen miR-494 auf. Während der Restenose deutlich hochreguliert, wird es während der Atherosklerose nach 12 Monaten mehr als 5fach weniger exprimiert (Abb. 17A, B). Zudem wird miR-494 infolge von mitogener

Stimulation eher verringert exprimiert (Abb. 19A), während Apoptose keinen Effekt auf die Expression besitzt (Abb. 19C).

Das Cluster miR-143/145 wird während der Atherosklerose im Array nicht reguliert gefunden, während der Restenose findet sich eine Runterregulation (Abb. 17A, B). Auch dieses Cluster ist in der Tumorbilogie als reguliert vorbeschrieben⁸² und wurde hier genauer auf die Regulationmechanismen untersucht. Es zeigte sich, dass beide miRNAs aufgrund von mitogener und inflammatorischer Stimulation in ihrer Expression herunterreguliert wurden, während die Apoptose keinen Effekt zu haben scheint (Abb. 19A, B, C). Aufgrund der deutlichen und einheitlichen Regulationen, sowie der vorherrschenden Expression von mir-145 in SMCs (Abb. 18), wurde dieses Cluster ausgewählt im Folgenden genauer auf eine mögliche Funktion hin untersucht zu werden.

MiR-146a – während der Atherosklerose und Restenose etwa 3fach hochreguliert, zeigt ein ähnliches Expressionsprofil nach inflammatorischer Stimulation (Abb. 19C). Apoptotische Stimulation kann die Expression nicht beeinflussen, während FCS zu einer verringerten Expression führt (Abb. 19B, A). MiR-146a als deutlich hochregulierte miRNAs während vaskuloproliferativer Erkrankungen wurde daher ebenfalls ausgewählt im Folgenden genauer auf die Funktion hin untersucht zu werden.

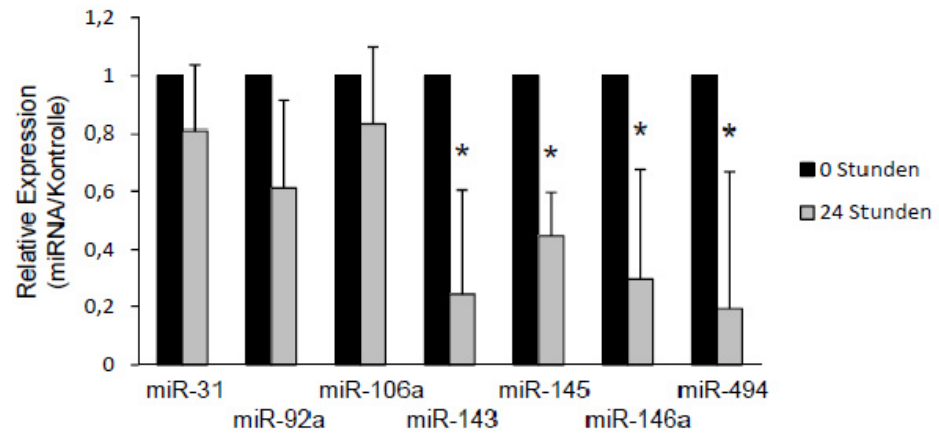
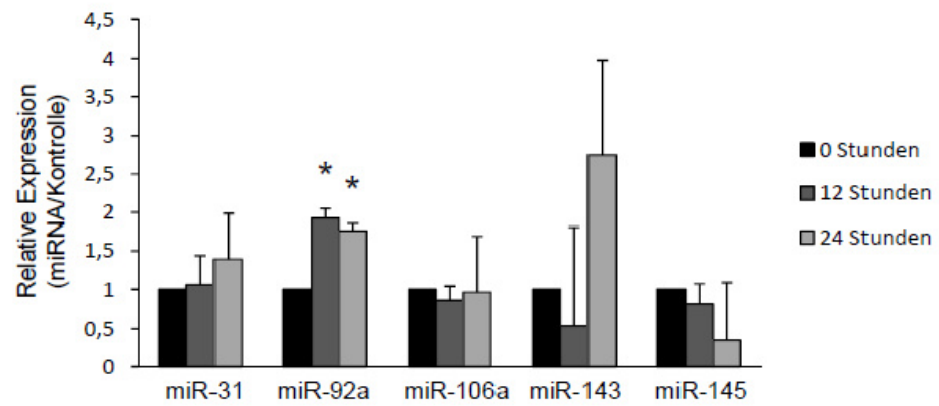
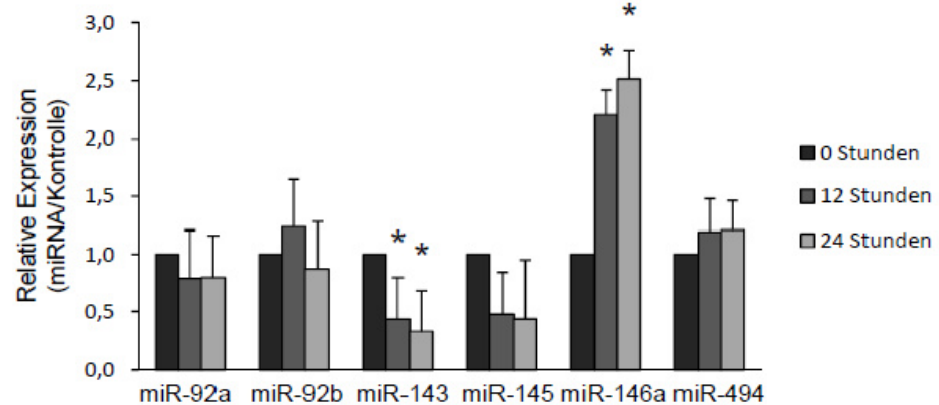
A**B****C**

Abb. 19: Übersicht über die Regulation ausgewählter miRNAs in SMCs nach mitogener (A), apoptotischer (B) bzw. inflammatorischer (C) Stimulation

4.2.3 miR-146a

MiR-146a wurde im Array während der Atherosklerose und der Restenose im Mausmodell reguliert vorgefunden. Interessant ist zudem, dass miR-146a nicht im Verbund eines Clusters steht, mit dem es exprimiert wird, was rein hypothetisch für eine möglicherweise wichtige funktionelle Bedeutung dieser einzelnen miRNA sprechen könnte. Obwohl sie vergleichsweise stärker in ECs exprimiert wird als in SMCs, wurde sie daher ausgewählt weiter charakterisiert zu werden.

Die Ergebnisse der Arrays zeigten in beiden Mausmodellen eine konstante Hochregulation von miR-146a. Und auch in der real-time PCR (Abb. 20) fand sich während der Restenose eine mehr als 10fache Hochregulation. Während der Atherosklerose steigerte sich die Expression im Verlauf der 12 Monate mit der Zeit. Die Konzentration von miR-146a nach 6 und 12 Monaten war mit einer mindestens 20 fach erhöhten Expression sehr hoch.

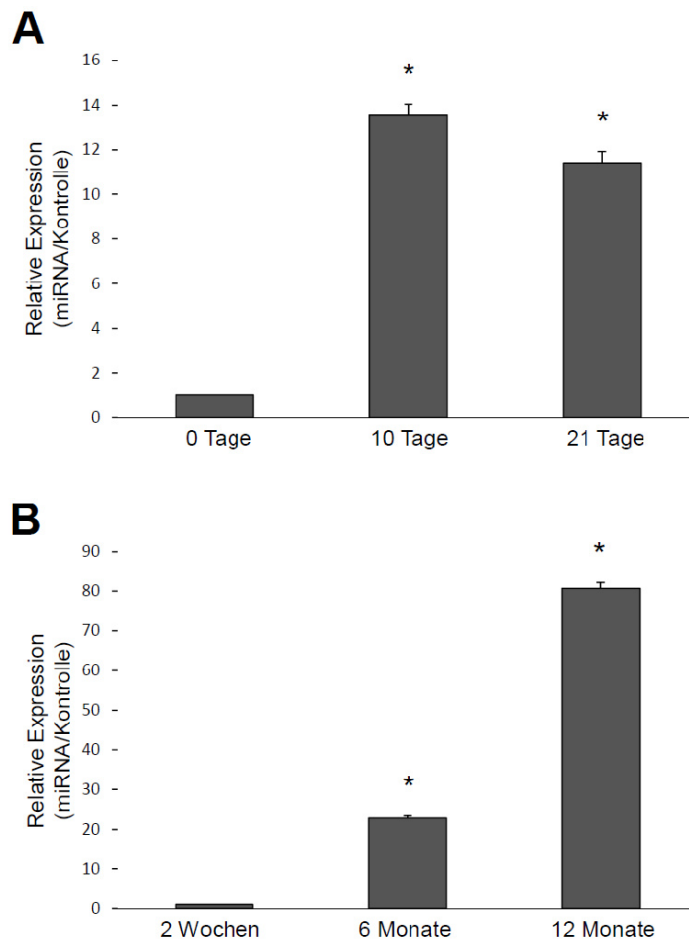


Abb. 20: Regulation von mmu-miR-146a während der Restenose (A) und Atherosklerose (B) im Mausmodell

4.2.3.1 Die funktionelle Bedeutung von hsa-miR-146a *in vitro*

Um die Rolle von miR-146a auf die Funktion von SMCs während der Entwicklung vaskuloproliferativer Erkrankungen untersuchen zu können, wurde die miRNA *in vitro* mittels spezifischer Clear-miR ausgeknockt. Dies führte in SMCs zu einer verringerten Proliferation (Figur 21A), die sich noch deutlicher in einer verringerten Zellzahl im Vergleich zur Kontrolle äußerte (Figur 21B). Die migratorischen Eigenschaften von SMCs, stimuliert durch FCS, blieben durch den Knockdown unbeeinflusst (Figur 21C).

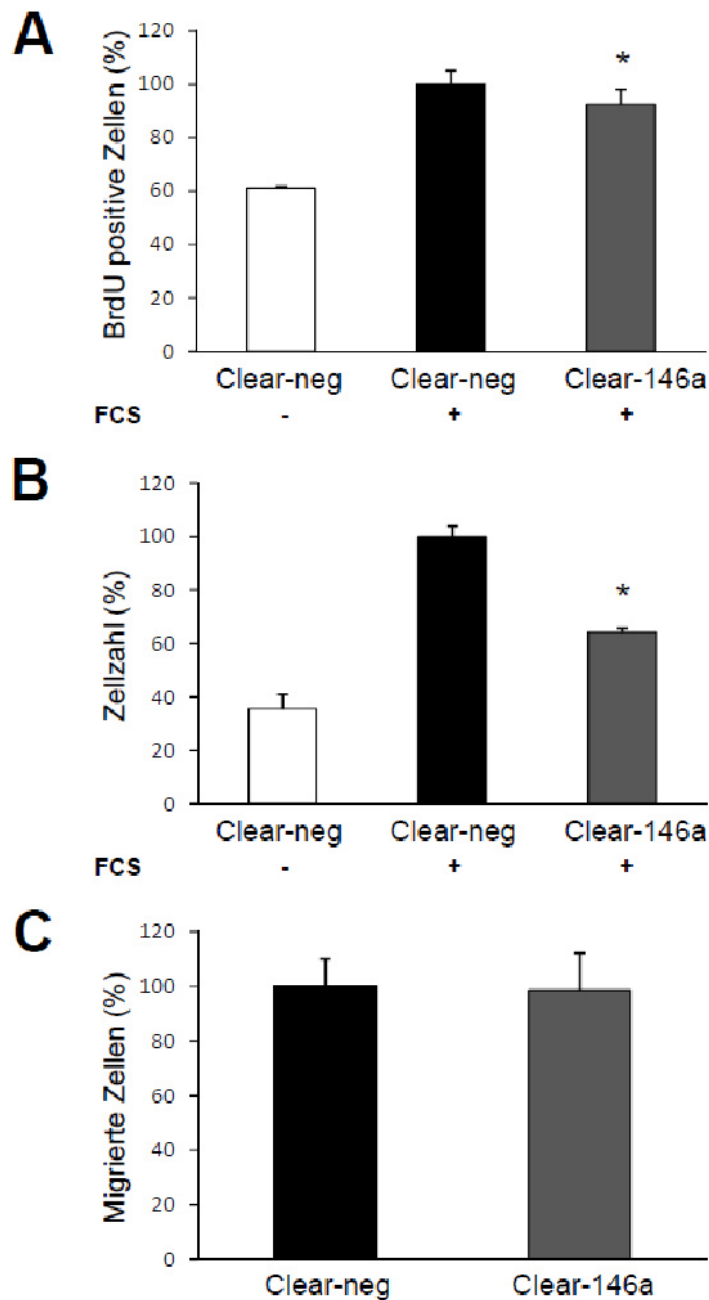


Abb. 21: Effekte eines Knockdowns von hsa-miR-146a in SMCs auf die Proliferation (A, BrdU Inkorporation), Zellzahl (B, Wst-1 Metabolisierung) und Migration (C, modifizierter Boydenchamber Assay)

4.2.4 miR-143/145

MiR-143 und -145 wurden im Array während der Restenose im Mausmodell herunterreguliert vorgefunden, während die Atherosklerose die Expression nicht zu beeinflussen schien.

Bei der Untersuchung, welche Stimuli die Expression dieser beiden miRNAs beeinflussen, führte besonders die mitogene Stimulation mittels FCS zu einer signifikant erniedrigten Expression (Figur 19A), daher wurden sie ausgewählt um auf ihre funktionelle Bedeutung für SMCs hin analysiert zu werden. Interessant ist zudem, dass beide miRNAs ein eigenes Cluster bilden und in unmittelbarer Umgebung auf dem Chromosom 5 kodiert sind, was für eine kombinierte Expression und möglicherweise auch Wirkung sprechen könnte.

In der real-time PCR sollten die Ergebnisse des Arrays (Figur 17) nun bestätigt werden. Während der Restenose zeigte sich, dass sowohl miR-143 als auch miR-145 signifikant weniger exprimiert wurden. Während der Atherosklerose hingegen ergaben die real-time Ergebnisse eine deutliche Hochregulation beider miRNAs nach 6 Monaten, die nach 12 Monaten nachlässt bzw. bestand bei miR-143 immer noch eine leicht verstärkte Expression im Vergleich zu gesunden Gefäßen, während die Expression von miR-145 fast auf null zurückging (Figur 22A, B).

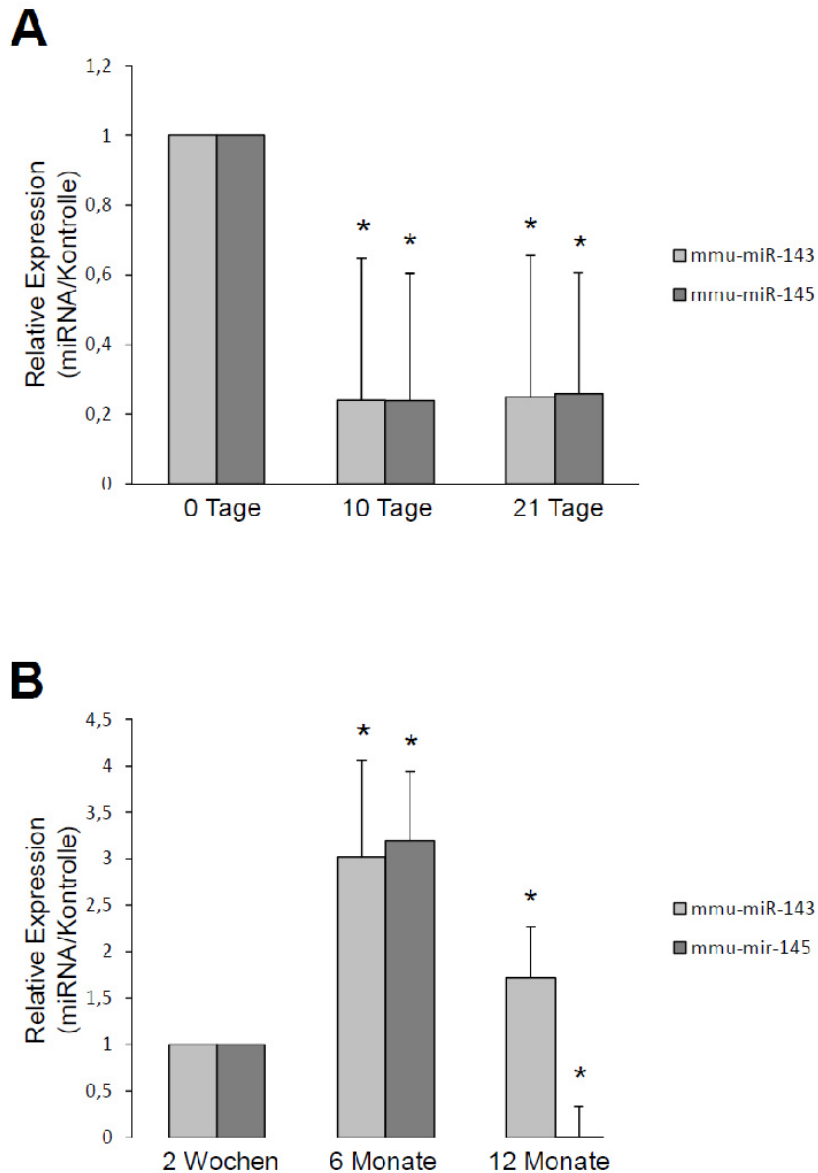
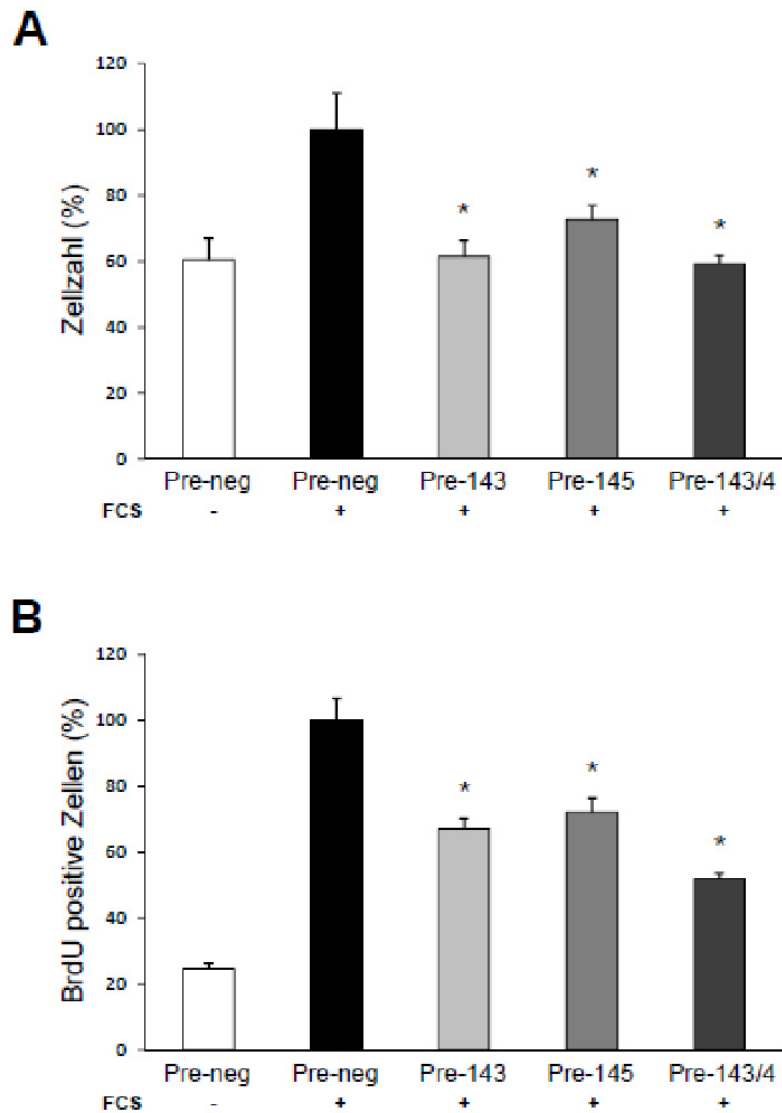


Abb. 22: Regulation von mmu-miR-143 und -145 während der Restenose (A) und Atherosklerose (B) im Mausmodell

4.2.4.1 Die funktionelle Bedeutung von hsa-miR-143/145 *in vitro* in SMCs

Um zu untersuchen, ob die vorgefundene Regulation von miR-143 und -145 eine Bedeutung für die Funktion von SMCs besitzt, wurden beide miRNAs *in vitro* „überexprimiert“, d.h. SMCs wurden mit miRNA-Precursoren transfiziert. Dies führte unter mitogenen Bedingungen in der Zellkultur zu einer signifikant verringerten Zellzahl (Abb. 23A), die auf basalem Niveau blieb. Zudem offenbarte sich ein signifikanter Rückgang der Proliferation (Abb. 23B). Mit der kombinierten Transfektion mit Precursoren beider miRNAs konnte jeweils der stärkste Effekt erzielt werden. Zusätzlich wurden Veränderungen im Migrationsverhalten nach Transfektion untersucht. Es konnte durch die erhöhte

Konzentration von miR-143 und-145 aber kein Effekt detektiert werden (Abb. 23C). Dagegen zeigte sich eine leicht verstärkte Tendenz zur Apoptose nach Stimulation mit 0,5 M H_2O_2 (Abb. 23D).



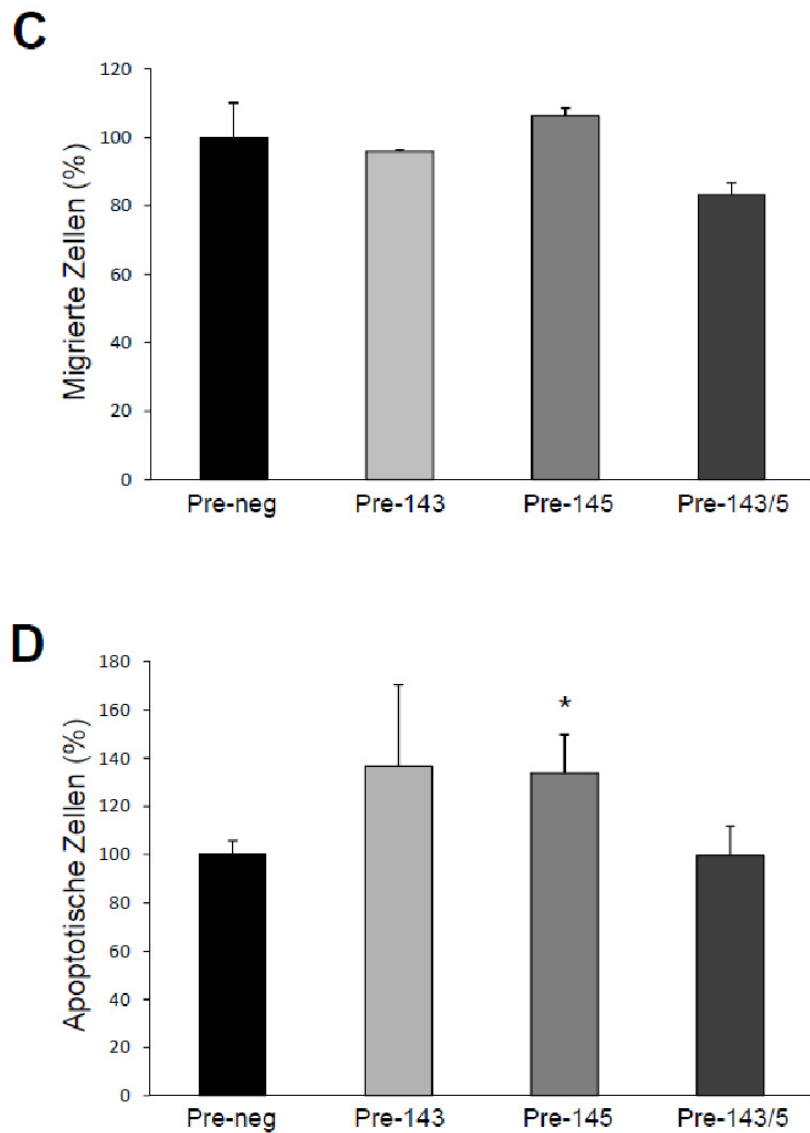


Abb. 23: Effekte einer Transfektion mit miRNA-Precursoren für hsa-miR-143 und -145 in SMCs auf die Proliferation (A, BrdU Inkorporation), Zellzahl (B, Wst-1 Metabolisierung), Migration (C, modifizierter Boydenchamber Assay) und Apoptose (D, Cell Death Detection Assay).

4.2.4.2 Die funktionelle Bedeutung von hsa-miR-143/145 *in vitro* in ECs

Obwohl man in der Behandlung bzw. Prävention der Restenose eine Inhibierung der Proliferation der SMCs anstrebt, wäre es wünschenswert, wenn die Proliferation von ECs unbeeinflusst bliebe. Ein wichtiger Faktor im Heilungsprozess nach Gefäßverletzung ist die Reendothelialisierung.

Um das Potential von miR-143/145 als potentielle Zielmoleküle zur therapeutischen Beeinflussung der Restenose besser beurteilen zu können wurde im Folgenden der Einfluss einer Überexpression auf das Proliferationsverhalten von ECs *in vitro* untersucht.

Durch Analyse der Wst-1 Metabolisierung zeigte sich, dass eine Überexpression bzw. Rekonstitution von miR-143 nach mitogener Stimulation mittels FCS keinerlei Effekt auf die Zellzahl besaß. Eine Überexpression von miR-145 und eine kombinierten Überexpression führte dagegen zu einer signifikant verringerten Zellzahl (Abb. 18A). Der BrdU Assay dagegen präsentierte keine signifikante Beeinflussung der Proliferation (Abb. 18B).

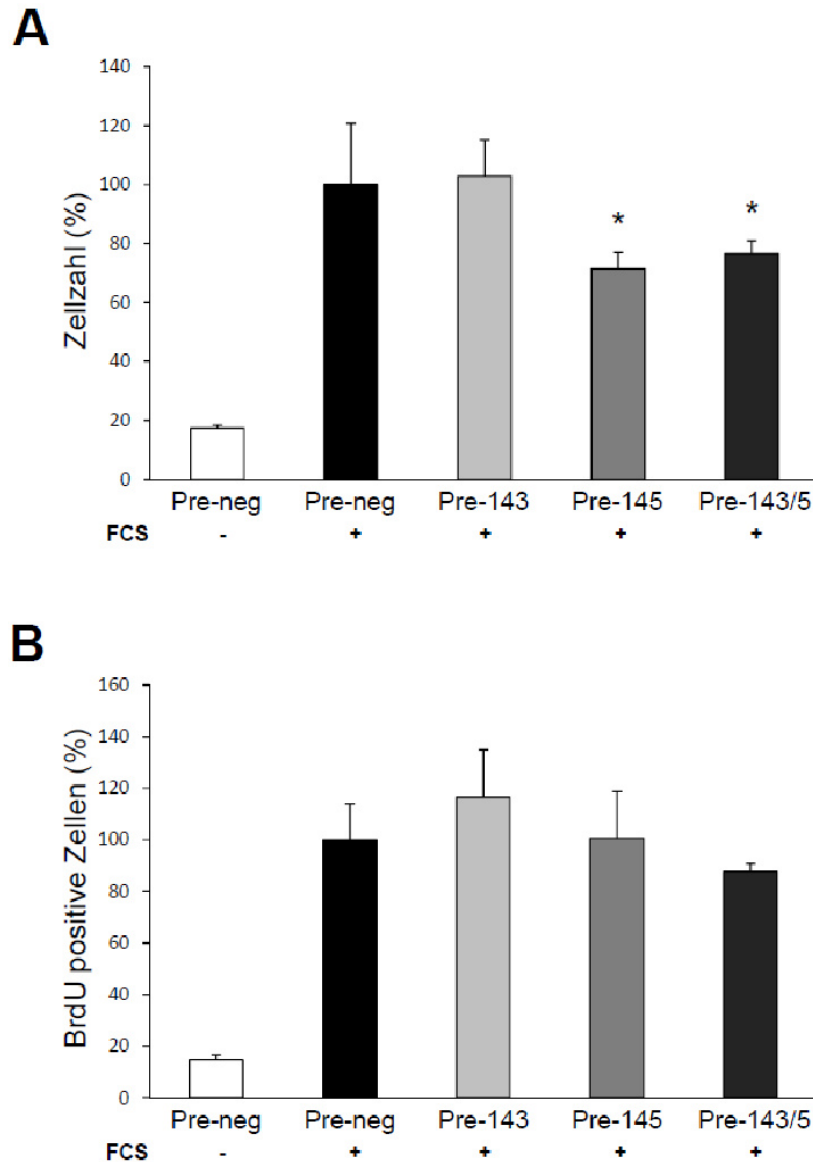


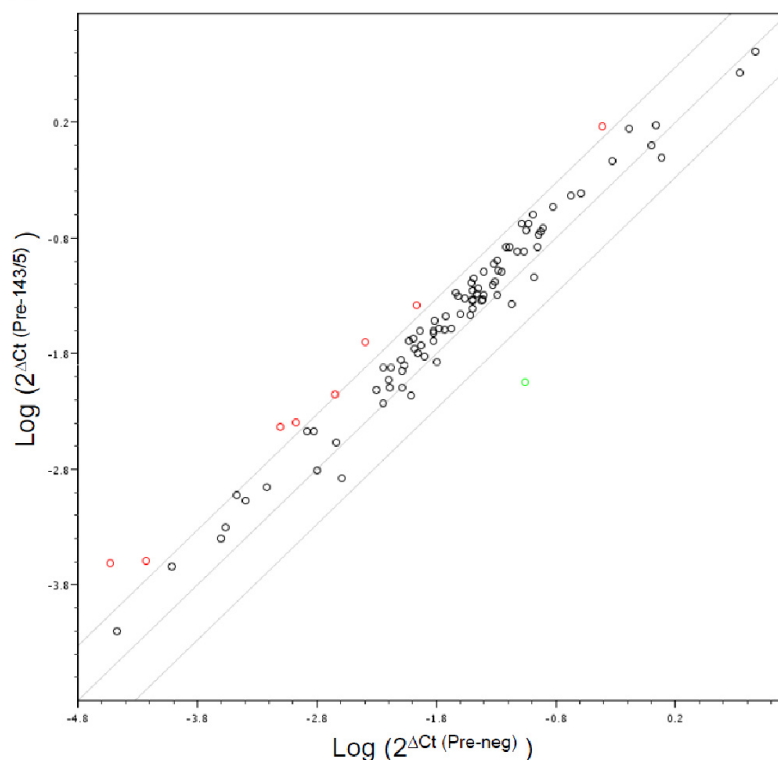
Abb. 24: Effekte einer Transfektion mit miRNA-Precursoren für hsa-miR-143 und -145 in ECs auf die Proliferation (A, BrdU Inkorporation), Zellzahl (B, Wst-1 Metabolisierung)

4.2.4.3 MiR-143/145 regulieren die Expression von Zellzyklusgenen

Um den Mechanismus über den miR-143/145 einen Einfluss auf die Proliferation nehmen aufzuklären, sollte ein PCR Array die Veränderungen in der Expression von Zellzyklusgenen aufzeigen. Hierfür wurde die Expression von 80 Genen der Zellzyklusmaschinerie mittels real-time PCR nach Überexpression von miR-143/145 im Vergleich zu einer Kontrolle determiniert. Abb. 25A zeigt, dass durch die Überexpression eher wenige Gene deutlich reguliert wurden. So waren etwa ein Viertel der untersuchten Gene mindestens zweifach hochreguliert, aber nur 7 mindestens dreifach (Abb. 25B). Eine Inhibierte Expression fand sich dagegen bei den in Abb. 25C dargestellten Genen. Durch einen Abgleich dieser Gene mit Datenbanken für die *in silico* Vorhersage möglicher Ziel-mRNAs (PicTar, mirBase, TargetScan) sollten mögliche direkte Targetgene von miR-143 und miR-145 identifiziert werden.

Dieser Vergleich offenbarte, dass drei der herunterregulierten Gene als mögliche Targets von miR-143 in Frage kommen: CDK5RAP2 (Cyclin-abhängige Kinase 5 assoziierte regulatorische Untereinheit 2), das am stärksten herunterregulierte Gen, sowie CDK4 (Cyclin-abhängige Kinase 4) und RB1 (Retinoblastoma Protein 1).

A



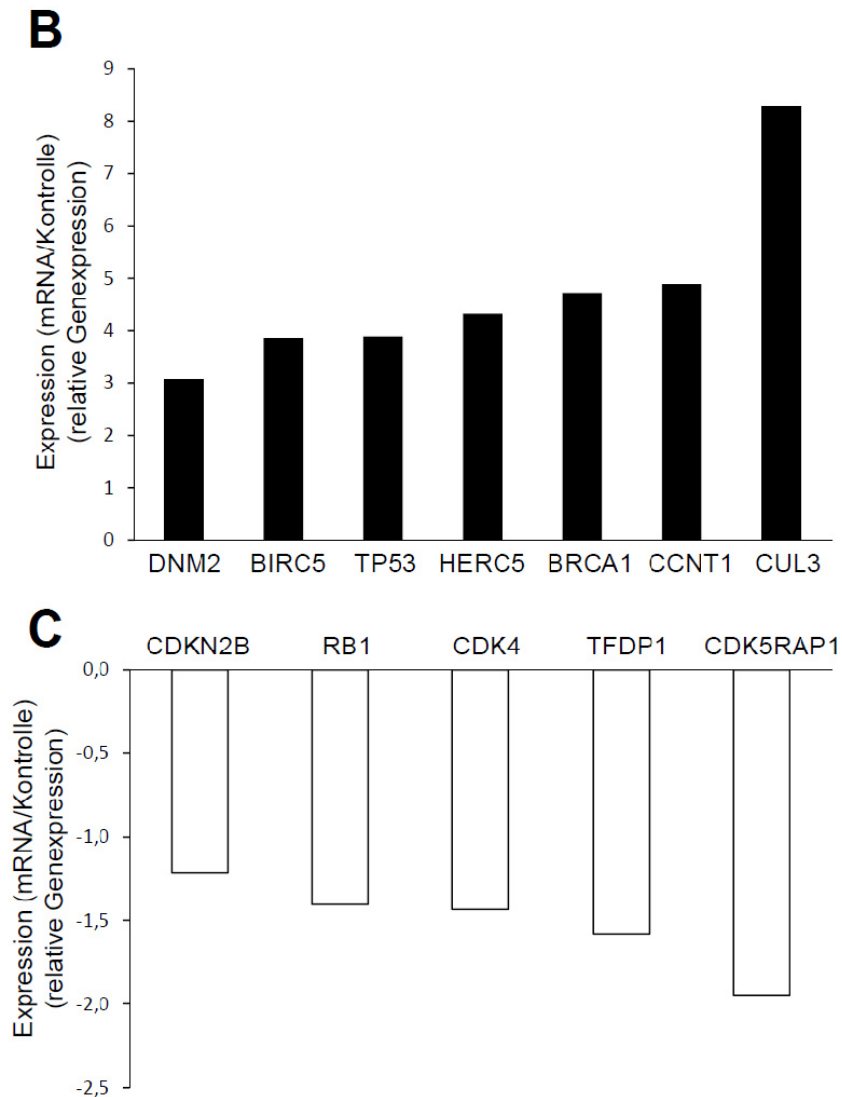


Abb. 25: Effekte einer kombinierten Transfektion mit miRNA-Precursoren für hsa-miR-143 und -145 in SMCs auf die Genexpression auf mRNA Ebene. A, Scatter Plot eines PCR Arrays, Pre-143/145 transfizierte SMCs im Vergleich zur Kontrolle. B, Übersicht über die Gene, die durch die Transfektion mindestens dreifach hochreguliert wurden. C, Übersicht über die Gene, die nach Transfektion herunterreguliert wurden.

4.3 Etablierung einer *in vivo* Transfektionsmethode zum Knockdown von miRNAs

Um zukünftig auch *in vivo* miRNA Precursor und Inhibitoren lokal applizieren zu können, wurde ähnlich wie für die *in vivo* Versuche in 4.1.6 die Transfektionsmethode mittels Pluronic Gel für zunächst miRNA Inhibitoren optimiert. Hierfür wurde ein cy3-gekoppelter miRNA Inhibitor in verschiedenen Konzentrationen (10, 15, 20 µg) mit unterschiedlichen N/P Verhältnissen (4, 6, 10) kombiniert, mit dem Pluronic Gel vermischt und in Mäusen um die Femoralarterie appliziert. Nach 24 Std. wurden die Gefäße

entnommen und in den Gefäßschnitten die Transfektionseffizienz evaluiert. Die größte Effizienz konnte erreicht werden bei Transfektion mit 20 µg Inhibitor und einem N/P Verhältnis von 4 (Abb. 26).

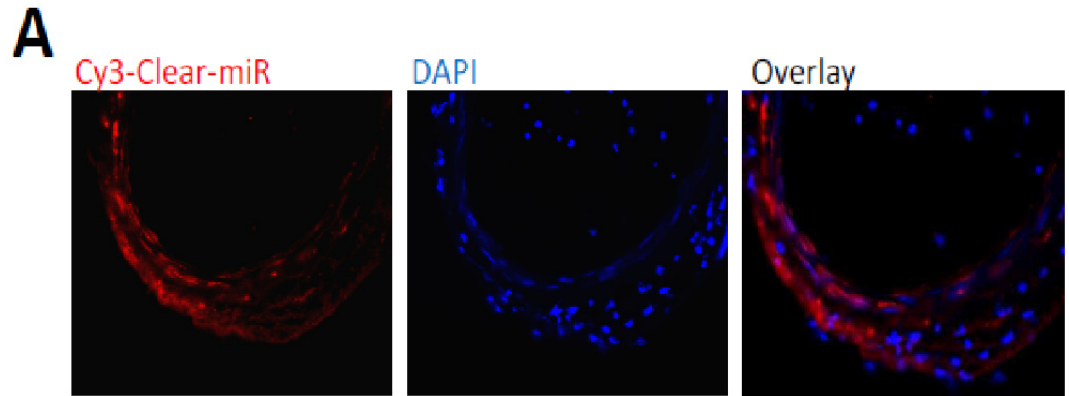


Abb. 26: A, Gefäßquerschnitte von murinen Femoralarterien 24 Std. nach Transfektion mit cy3 gekoppeltem miRNA-Inhibitor, rot: cy3 Signal des Inhibitors, blau: DAPI Zellkernfärbung

5. Diskussion

Neben den inflammatorischen Prozessen spielt besonders die Proliferation glatter Gefäßmuskelzellen eine entscheidende Rolle in der Pathogenese vaskuloproliferativer Erkrankungen. Üblicherweise befinden sich SMCs in einem nicht proliferativen, ruhenden Stadium in der Tunica media des Gefäßes. Verletzung oder mechanischer Stress bewirken eine Migration der SMCs in die Intima des Gefäßes, wo sie proliferieren und somit eine Verdickung der Intima bewirken. Diese neointimale Proliferation glatter Gefäßmuskelzellen bildet die Grundlage für die Entwicklung vaskuloproliferativer Erkrankungen.^{58, 101, 102}

Aus diesem Grund ist es von entscheidender Bedeutung, Regulationsmechanismen zu identifizieren, die die Antwort der glatten Gefäßmuskelzellen auf eine Verletzung der Gefäßwand regulieren. Ebenso kann die Identifizierung und Charakterisierung der an diesen Signaltransduktionsmechanismen beteiligten Moleküle helfen, die zukünftige Entwicklung sicherer und effizienter Strategien für die Prävention und Behandlung vaskuloproliferativer Erkrankungen voranzutreiben.

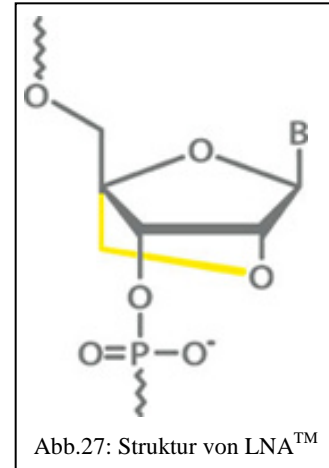
Es war bisher nicht bekannt, ob miRNAs einen Einfluss auf die Funktion von SMCs, und damit auf die Pathogenese vaskuloproliferativer Erkrankungen besitzen.

Die hier vorgestellten Ergebnisse geben erstmals einen Hinweis darauf, dass miRNAs generell einen entscheidenden Einfluss auf die Entstehung dieser Erkrankungen haben und dass einzelne miRNAs das Potential besitzen in diese Pathomechanismen kompensierend einzugreifen. MiRNAs als therapeutisches Mittel besitzen den Vorteil, dass wirklich initial, d.h. schon auf mRNA-Ebene, in maligne wirkende Signalkaskaden eingegriffen werden könnte anstatt wie sonst üblich die Auswirkungen auf Proteinebene anzugehen.

Zusätzlich besitzen miRNAs die interessante Eigenschaft parallel sehr große Gruppen von Genen zu regulieren, somit besitzt eine einzige miRNA bzw. ein einziges miRNA Cluster das Potential die funktionelle Ausrichtung einer Zelle ganzheitlich umzuprogrammieren.

Ihre Beeinflussung könnte in Zukunft somit einen neuartigen, attraktiven gentherapeutischen Ansatz darstellen, nachdem Gentherapeutische Strategien mittels viraler Vektoren in der Vergangenheit in klinischen Studien am

Menschen leider unvorhersehbare, zum Teil tödliche Nebenwirkungen gezeigt hatten.¹⁰³ Zum Knockdown von miRNAs gibt es *in vivo* vielversprechende Methoden. Mit Hilfe von „Antagomirs“, speziell modifizierten Antisense-Molekülen zur Ziel-miRNA, konnten einzelne miRNAs im Mausmodell spezifisch sehr langanhaltend runterreguliert werden.⁴⁴ Eine Weiterentwicklung stellen LNA-modifizierte anti-miRs (Exiqon) dar. Hierbei handelt es sich um modifizierte zur miRNA komplementäre Oligonukleotide, die neben dem *in vivo* üblichen Phosphorothioate-„Rückgrat“ eine weitere Modifikation besitzen. So ist das 2'-O Atom mit dem 4'-C Atom des Riboserings durch eine Methylenbrücke „geschlossen/locked“. Dies ergibt den Vorteil, dass nach Paarung mit der miRNA die Schmelztemperatur um 2-8°C erhöht ist im Vergleich zu anderen komplementären Oligonukleotiden. Dadurch erhöht sich die Stabilität und Spezifität der Duplexbildung.



Von dieser Variante reichen deutlich geringere Dosen (1-25 mg/kg KG statt 80 mg/kg KG), um *in vivo* eine effizientere Wirkung im Vergleich zu Antagomirs zu erzielen. Auch an nicht-humanen Primaten wurde eine LNA-antimiR gegen miR-122 schon erfolgreich getestet ohne das LNA-induzierte Toxizität oder histopathologische Veränderungen auftraten.¹⁰⁴ Die erste klinische Phase I Studie initiiert von Santaris Pharma startete im Mai 2008. Ergebnisse sind noch nicht bekannt. LNA-anti-miR-122 soll bei der Behandlung von Hepatitis C Infektionen eingesetzt werden, da miR-122 in Leberzellen zur Replikation des Virus beiträgt. Die Ergebnisse dieser Studie sind ein wichtiger Schritt zur Evaluierung, ob miRNA-basierenden Therapeutika in der Praxis am Menschen geeignet sein könnten.

Mit dem Ansatz miRNAs als therapeutisches Mittel zu benutzen könnte demnach der virale Ansatz umgangen werden. Hoffnung auf Erfolg gibt auch der bisher erfolgreiche Einsatz von anderen Oligonukleotiden (siRNAs) in klinischen Studien.

5.1 Diskussion der *in vivo* Modelle

5.1.1 Restenose: Dilatation der Femoralarterie in C57BL6/N Mäusen

Zur Untersuchung der Restenose *in vivo* wurde das von Sata *et al.* im Jahr 2000 publizierte Mausmodell der Dilatation der Femoralarterie ausgewählt.¹⁰⁵

Daneben existieren weitere Modelle. So entwickelte Lindner *et al.* eine Methode, anhand der durch intraluminales Einführen eines Drahtes in die Carotis die Entstehung von intimalen Läsionen nach 2 Wochen erzielt werden konnte.¹⁰⁶ Allerdings bedeckten diese Läsionen eine eher kleine Fläche und erreichten nur eine Dicke von zwei bis drei Zellschichten.¹⁰⁷ Außerdem wird in diesem Modell die Entstehung von Läsionen erheblich vom genetischen Hintergrund der Mäuse beeinflusst.^{108, 109} Zusammen mit der limitierten proliferativen Zellantwort und dem technischen Anspruch besitzt diese Methode deutliche Nachteile. Eine weitere Alternative wäre die Arbeit mit Ratten. Hier ist der Vorteil, dass durch die größeren Gefäße eine Ballonangioplastie durchgeführt werden kann.

In diesem Projekt wurde sich trotzdem für Mäuse entschieden, da hierdurch die Möglichkeit besteht, die Experimente auf Knockout Tiere auszuweiten. So könnten die in dieser Arbeit gewonnenen Daten beispielsweise an Dicer Knockout Mäusen verifiziert werden.

Die von uns gewählte Methode der Dilatation der murinen Femoralarterie ist einer Ballonangioplastie nachempfunden. Durch Ligation am distalen und proximalen sichtbaren Ende der Femoralarterie wird der Blutfluss unterbrochen. An dem abgehenden Ast der Femoralarterie (Arteria Profunda femoris) wird das Gefäß eröffnet und ein Draht mit einem etwas größeren Durchmesser als das Gefäß in die Femoralarterie eingeführt. Nach einer Minute wird der Draht wieder entfernt, das eröffnete abgehende Gefäß ligiert und der Blutfluss wieder hergestellt (Abb. 28).

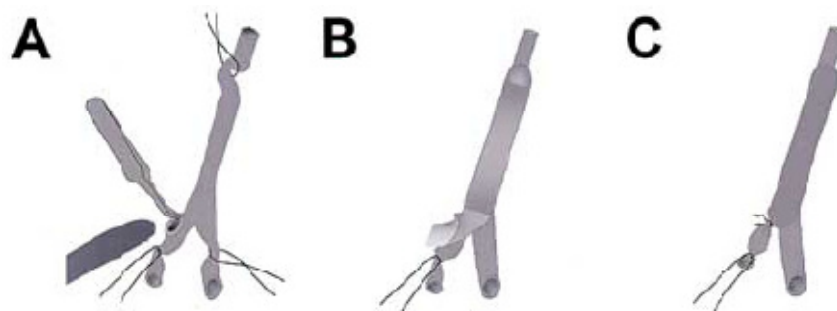


Abb. 28: A, B, C, Schema der endovaskulären Verletzung der Femoralarterie

In der Folge der Überdehnung durch den Draht, bleibt das Gefäßlumen dauerhaft erweitert, die Media ist ausgedünnt. Während die externe Lamina des Gefäßes erweitert ist, verringert sich das Gefäßlumen durch eine fortschreitende Hyperplasie der SMCs in der Regel über den gesamten Bereich der Dilatation. Als seltene Nebenwirkung treten Thrombosen auf, diese Mäuse wurden nicht zur Auswertung herangezogen. Außerdem stellt sich postoperativ eine rasche Ausbreitung von Apoptose ein. Dieser pathogene Verlauf ähnelt sehr der menschlichen Restenose.

Als Zeitpunkt für Analysen wurden 10 und 21 Tage nach Operation gewählt, da nach 10 Tagen die proliferative Phase des Gefäßremodellings beginnt, während nach 21 Tagen die Proliferation der SMCs abschließt (Abb. 29).

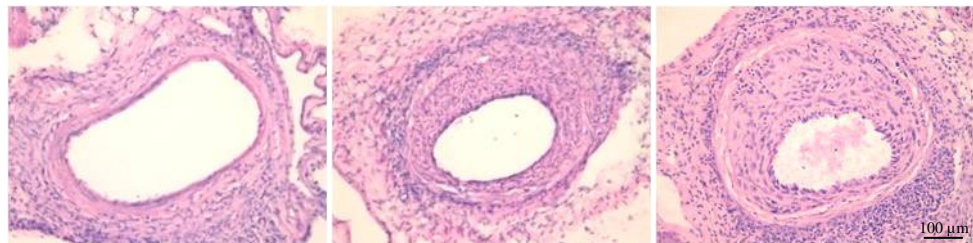


Abb. 29: HE-gefärbte Gefäßschnitte der Femoralarterie, von links: nicht dilatiertes Kontrollgefäß, 10 Tage nach Dilatation, 21 Tage nach Dilatation

5.1.2 Atherosklerose: ApoE/LDLr^{-/-} Mäuse

Das geeignetste Tiermodell zur Untersuchung der Atherosklerose, welches die Erkrankung beim Menschen am besten widerspiegelt, ist das Schwein. In Folge cholesterolreicher Ernährung erreichen Schweine Plasmalevel und atherosklerotische Läsionen, die den menschlichen sehr ähneln. Ein großes Problem stellen jedoch die Tierhaltung und die hohen Kosten dar. Mäuse sind dagegen in der Regel resistent gegenüber der Entwicklung einer Atherosklerose mit Ausnahme des C57BL6 Stammes.

Dieser wird heutzutage weithin genutzt, trotzdem sollte man wichtige Unterschiede zum Menschen im Hinterkopf behalten. So liegen natürlich die Lebensspanne von Mäusen bei nur 2 Jahren und ihr Gewicht bei durchschnittlich 30 Gramm. Daneben unterscheidet sich auch das Lipidprofil deutlich vom Menschen. Beim Menschen liegen 75% des Cholesterols als LDL (low density lipoprotein) vor, während Mäuse den Großteil ihres Cholesterols

als HDL (high density lipoprotein) im Blut transportieren, das beim Menschen protektiv gegenüber Atherosklerose wirkt. So entwickeln Mäuse auch bei high-fat Ernährung im Gegensatz zum Menschen keine Atherosklerose.

Dieses Problem wurde durch verschiedene Ernährungsvarianten, wie z.B. der Western diet (ähnlich der durchschnittlichen amerikanischen Ernährung), und der Herstellung verschiedener Knockout Varianten, in denen Gene des Lipidmetabolismus ausgeschaltet wurden, gelöst.

Hierbei handelte es sich meistens um Gene, die für die Aufnahme der zirkulierenden Lipoproteine (VLDL, LDL, HDL) aus dem Blut verantwortlich sind. Durch den Knockout werden erhöhte Blutfettwerte geschaffen und somit eine Prädisposition zu atherosklerotischen Erkrankungen.

Ein besonderer Durchbruch war die Herstellung der ApoE^{-/-} Maus. Diese Tiere besitzen deutlich erhöhte Cholesterolspiegel, erhöhte Werte für Triglyceride, Chylomikronen und VLDL, aber nur um 45% erhöhte HDL-Werte. Eine chronologische Analyse der Geschehnisse während der Entstehung atherosklerotischer Läsionen in diesem Mausmodell zeigte starke Ähnlichkeit zur Atheroskleroseentstehung in größeren Tiermodellen und im Menschen.¹¹⁰

Läsionen entwickeln sich bevorzugt an vaskulären Verzweigungen und entwickeln sich vom Schaumzellstadium zu fibroproliferativen Stadien mit klar definierter fibröser Kappe und nekrotischen Lipidkern. Allerdings treten in Mausmodellen keine Plaquerupturen auf. Es wird vermutet, dass der Grund in der hohen Oberflächenspannung der kleinen Gefäße liegt, der Durchmesser der Aorta beträgt weniger als 1 mm.

In diesem Projekt wurde zur Untersuchung der Atherosklerose das ApoE^{-/-}/LDLr^{-/-} Doppel-knockout Mausmodell benutzt. Der zusätzliche Knockout des LDL Rezeptors führt zur Erhöhung des LDL und VLDL (very low density lipoprotein) Cholesterols und damit zu Werten, die dem Menschen noch ähnlicher sind.

Diese Tiere entwickeln trotz normaler Ernährung schwere Hyperlipidämie und Atherosklerose.^{111, 112} Nach 6 Monaten sind im Aortenbogen bereits deutlich Plaques zu erkennen, die sich nach 12 Monaten noch deutlich vermehrt haben.

Abb. 30 zeigt eine Übersicht über den Cholesterolgehalt im Plasma verschiedener Knockout Mäuse. Die Spiegel von ApoE^{-/-}/LDLr^{-/-} Mäusen weisen bei normaler Ernährung die höchsten Werte auf, wobei keine

Unterschiede zwischen Männchen und Weibchen festgestellt werden konnten.¹¹¹

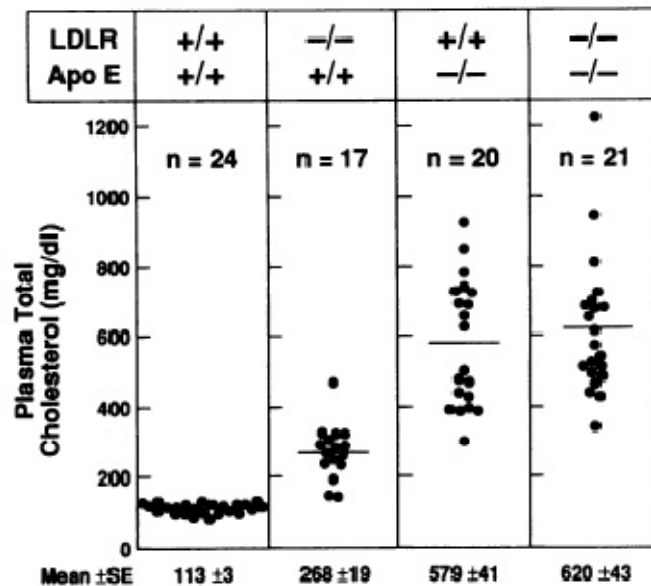


Abb. 30: Plasmacholesterolkonzentrationen in Mäusen verschiedener Genotypen bei normaler Ernährung (Alter: ca. 7 Wochen im Durchschnitt)

In unseren Versuchen wurden nur Männchen benutzt, um Effekte durch hormonelle Schwankungen auszuschließen.

5.2 Die Bedeutung von Dicer und Drosha – und damit der Expression von miRNAs - für vaskuloproliferative Erkrankungen

Dicer und Drosha sind verantwortlich für die Spaltung der primären miRNAs in die aktive mature Form. Um eine mögliche Bedeutung von miRNAs für vaskuloproliferative Erkrankungen zu evaluieren wurde zunächst die Expression und funktionelle Bedeutung dieser beiden Enzyme analysiert. Bisherige Veröffentlichungen konnten zeigen, dass Dicer für die embryonale Entwicklung des Gefäßsystems essentiell ist⁶⁷ und auch eine wichtige Rolle für die Entwicklung und Funktion des Herzens spielt.⁶⁶ Hier sollte nun die Rolle der miRNAs im adulten Gefäßsystem und während vaskuloproliferativer Erkrankungen untersucht werden.

5.2.1 Expression von Dicer und Drosha *in vivo* und die funktionelle Bedeutung der Expression *in vitro*

In initialen Experimenten wurde zunächst die Expression von Dicer und Drosha während vaskuloproliferativer Erkrankungen im Mausmodell analysiert. Während der Atherosklerose und Restenose konnten wir erstmals zeigen, dass beide Enzyme signifikant in ihrer Expression herunterreguliert sind. Um dieses Ergebnis in der *in vitro* Situation nachzuvollziehen, wurden Dicer und Drosha mittels spezifischer siRNA in SMCs, der in intimalen Läsionen vorherrschenden Zellart, ausgeknockt. Dies resultierte in global reduzierten miRNA Leveln, was bisherige Ergebnisse in ECs bestätigt.^{69, 70} Wenn miRNAs nun die Funktion von SMCs regulieren, sollte ein solcher Knockdown funktionelle Auswirkungen aufweisen. In der Tat führte der Knockdown von sowohl Dicer als auch Drosha zu einer signifikant verstärkten Proliferation von SMCs, zudem auch zu einer erhöhten Migration. Diese Ergebnisse stehen im Gegensatz zu kürzlich veröffentlichten Erkenntnissen in ECs. Hier führte ein siRNA vermittelter Knockdown von Dicer zu einer verringerten Proliferation und auch Migration der Zellen,^{69, 70} während ein Knockdown von Drosha keinen Einfluss auf die Migration besaß.⁷⁰

Unter apoptotischen Bedingungen war kein Einfluss von Dicer und Drosha in SMCs messbar. Dagegen zeigten Asada et al.¹¹³ dass in ECs die Apoptoserate nach Dicer Knockdown unter Serumbedingungen zwar nicht beeinträchtigt, aber unter serumfreien Bedingungen signifikant erhöht war.

Betrachtet man nun die Auswirkungen eines Knockdowns von Dicer und Drosha auf den Zellzyklus genauer, zeigte sich in der FACS Analyse ein verstärkter Eintritt der Zellen in die G2/M-Phase und somit eine verstärkte Progression. Ein möglicher Mechanismus könnte mit der Hochregulation einiger Zellzyklusgene zusammenhängen, die nach Knockdown von Drosha identifiziert werden konnten, wie SKP2, CDK4 und CDK6. Diese Gene sind besonders für die Zellzyklusprogression von der G1-Phase an verantwortlich und könnten somit auch die Ursache für das in der FACS Analyse beobachtete Shifting sein. Ein ähnliches Ergebnis zeigte sich auch in LKR13 Zellen (Mouse Lung Adenocarcinoma), in denen die miRNA Expression durch shRNA gegen Drosha, DGCR8 und Dicer inhibiert wurde. Dies führte zu einem verstärktem Eintritt der Zellen in die S-Phase und erhöhte die Proliferationsrate.⁸⁷

Zusätzlich konnten Suarez et al. zeigen, dass ein Dicer Knockdown in ECs zu einer erhöhten Expression von Wachstumsfaktoren wie TEK/Tie-2, KDR/VEGFR2, von Adhesionsmolekülen, Matrixremodelingproteinen und Proteinen des endothelialen Nitritoxidsynthase Signalwegs führt,⁶⁹ also teilweise ebenfalls pro-proliferativen Prozessen, die im Gegensatz zu der von ihr vorgefundenen verringerten Proliferationsrate *in vitro* stehen. Da diese Faktoren eher Endothelzellspezifisch exprimiert werden, wurden sie in SMCs nicht untersucht.

Ein deutlich anti-proliferativer Effekt zeigte sich in MCF-7 Zellen, einer Brustkrebszelllinie, in der ein Dicer Knockdown in einem Arrest der Zellen in der G1-Phase resultierte.

Ein Zusammenhang zwischen diesen Ergebnissen bleibt zu klären. Die sehr zelltypspezifische Wirkung ist auffällig und lässt sich möglicherweise mit der zellspezifischen Expression von miRNAs beantworten. Wird in verschiedenen Zelltypen jeweils ein gewisses Set an miRNAs exprimiert und diese dann durch einen generellen Knockdown der miRNAs herunterreguliert, könnte das auch verschiedene Auswirkungen nach sich ziehen.

5.2.2 Regulationsmechanismen der Expression von Dicer und Drosha

Interessant an der Expression von Dicer und Drosha ist die sehr deutlich verringerte Expression während der Atherosklerose und Restenose *in vivo* im Mausmodell. Um den verantwortlichen Faktor für diese Regulation zu identifizieren, wurden in ersten Experimenten SMCs mit den drei hauptsächlich in vaskuloproliferativen Erkrankungen wirkenden Stimuli – mitogen, apoptotisch, inflammatorisch – behandelt und die Expression von Dicer und Drosha untersucht.

Hierbei konnte FCS als verantwortlicher Faktor identifiziert werden, der in SMCs zu einer deutlich verringerten Expression beider Enzyme führt. Dagegen zeigen apoptotische und inflammatorische Stimuli inkonsistente Expressionsregulationen. So könnten für die Runterregulation von Dicer auch apoptotische Reize mitwirken, während inflammatorische eine eher untergeordnete Rolle spielen werden, da sie *in vitro* eine verstärkte Expression bewirken. Dagegen zeigt die Expression von Drosha keinerlei Beeinflussung

durch apoptotische Stimuli, während auch inflammatorische Reize zu einer verminderten Expression führen.

Einen deutlichen Einfluss besitzt in jedem Fall der mitogene Stimulus für die *in vivo* beobachtete verringerte Expression von Dicer und Drosha.

In ECs zeigte sich für diese Bedingungen wieder ein gegenläufiges Bild. So führte in diesem Zelltyp Serumentzug zu einer verringerten Expression von Dicer und Drosha, die durch Zugabe von VEGF und S1P wieder rekonstituiert werden konnte.¹¹³

Es scheinen in den verschiedenen Zelltypen sehr gegenläufige Regulationsmechanismen zu existieren, für deren Aufklärung weitere Experimente nötig sind.

Zur Expression von Dicer veröffentlichten Tokumaru *et al.*¹¹⁴ im letzten Jahr erstmals einen posttranskriptionalen Regulationsmechanismus durch let-7. Hauptsächlich in der pulmonalen Tumorzelllinie Calu6 zeigten sie die inverse Korrelation zwischen der Expression von Dicer und let-7 (let-7a, c, d) auf. So führte eine Überexpression von let-7 zu einer erniedrigten Expression von Dicer, während ein Knockdown von Dicer ebenfalls eine reduzierte let-7 Expression zur Folge hatte. Daraufhin postulierte die Gruppe eine negative Feedback Regulationsschleife. Für let-7a konnte eine direkte Bindungsstelle in der mRNA Sequenz von Dicer identifiziert werden.

Ob dieses Regulationsmodell auch in SMCs entscheidend wirkt ist fraglich.

Trotz der deutlichen Regulation von Dicer in murinen Gefäßen während der Atherosklerose und Restenose und auch in humanen SMCs, die mit Wachstumsfaktoren stimuliert wurden, konnten keine deutlichen Regulationen von let-7a,c oder 7d beobachtet werden (Daten teilweise nicht gezeigt). Generell werden Vertreter der let-7-Familie in SMCs sehr stark exprimiert, wie unser Screening in den verschiedenen Zelltypen zeigt, aber nur let-7b* und let-7f wurden in den vaskuloproliferativen Mausmodellen reguliert vorgefunden. Um eine endgültige Aussage zu treffen wären weitere Experimente in SMCs notwendig, aber die bisherigen Erkenntnisse sprechen gegen eine posttranskriptionale Expressionsregulation von Dicer durch let-7.

Um einen Regulationsmechanismus, der in SMCs für die deutliche Regulation von Dicer auf transkriptioneller Ebene verantwortlich sein könnte zu identifizieren, wurde in diesem Projekt zunächst eine *in silico* Promoteranalyse für Dicer im Menschen durchgeführt.

Diese zeigte unter anderem eine phylogenetisch sehr konservierte Bindungsregion für den FoxO1 Transkriptionsfaktor.

Dass die Aktivität von FoxO1 nachweislich auch durch FCS reguliert wird, gab einen ersten Hinweis darauf, dass FoxO1 möglicherweise auch für die FCS-vermittelte Regulation von Dicer und Drosha verantwortlich sein könnte.

In Säugetieren sind die FoxO Transkriptionsfaktoren vorbeschrieben als Regulatoren für Schlüsselfunktionen wie Zellzyklusprogression (p27^{Kip1}, RB/p130, cyclin B and D, polo-like kinases and p21^{Cip1}), DNA Reparatur (GADD45) und Apoptose (Fas Ligand, Bim, TRAIL, TRADD).^{17,18}

In Bezug auf Restenose konnte unsere Arbeitsgruppe in früheren Arbeiten zeigen, dass FoxO1 auch während dieser Pathogenese eine wichtige Rolle spielt. So induziert FoxO1 eine gesteigerte Expression von p27^{Kip1} auf mRNA und Protein Ebene, während die Expression von Cyklin D1 inhibiert wird. Demzufolge entsteht ein Zellzyklusstop während dem Übergang von der G1- zur S-Phase. Durch Überexpression von einer konstitutiv aktiven Form von FoxO1 *in vivo* im Restenose Mausmodell konnte die Neointimaentstehung gehemmt werden.

In diesem Projekt konnten *in situ* Färbungen zeigen, dass FoxO1 in SMCs der murinen Gefäßwand lokalisiert ist. In dilatierten Gefäßen, sowie SMCs unter Wachstumsbedingungen wird phosphoryliertes FoxO1 neben Akt exprimiert.

Unter serumfreien Bedingungen und in nicht dilatierten Gefäßen liegt FoxO1 nichtphosphoryliert im Zellkern vor und bindet aktiv an seine Promoterregion (Abb. 31). Dies führt zur Expression von überwiegend zellzyklusinhibierenden Genen, was sich bei einer Überexpression von FoxO1, in einer reduzierten Proliferation von SMCs äußerte.

Treten Wachstumsfaktoren auf, die den PI3K-Signalweg aktivieren, führt dies auch zu einer Aktivierung bzw. Phosphorylierung von Akt und in der Folge zur Phosphorylierung von FoxO1. Dies führt zur Delokalisation aus dem Zellkern ins Cytoplasma, wie Fluoreszenzmikroskopbilder zeigen konnten und somit

zur Inaktivierung des Transkriptionsfaktors. In der Folge wird die Inhibierung der Zellzyklusprogression aufgehoben.

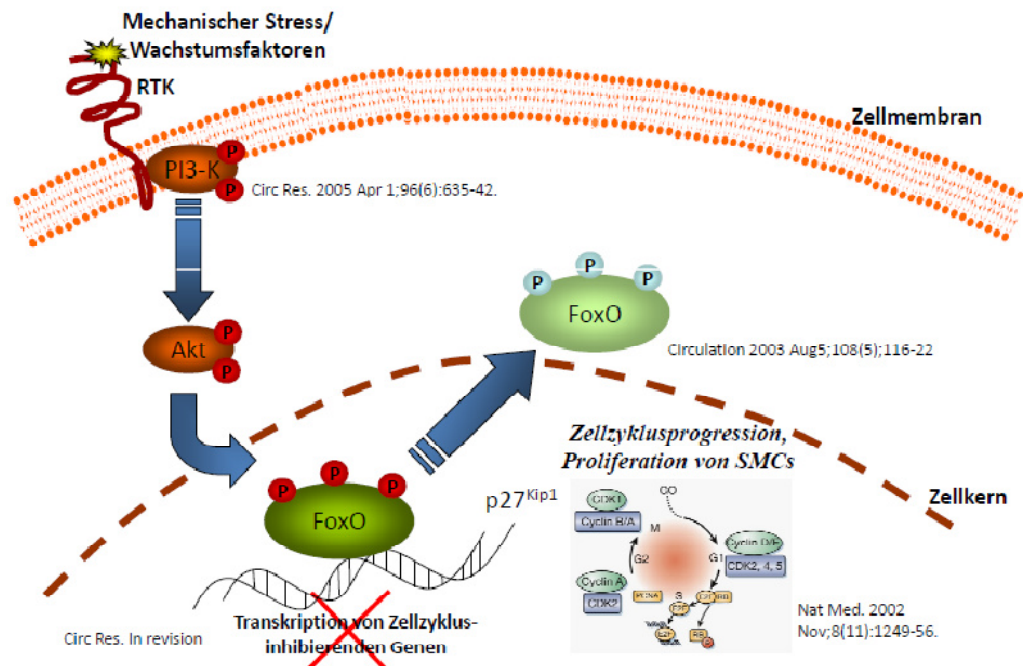


Abb. 31: Übersicht über die PI3K/Akt/FoxO Signalkaskade

Durch ChIP konnte in der Folge gezeigt werden, dass FoxO1 in der Tat an die *in silico* ermittelte Sequenz in der Promoterregion von Dicer bindet. Zusätzlich bestätigten Knockdown und Überexpressions- experimente von FoxO1 einen direkten Zusammenhang zur Expression von Dicer. Somit konnte erstmals ein Regulationsmechanismus der Expression von Dicer in SMCs identifiziert werden.

Offen bleibt, ob für die Expression von Drosha ein ähnlicher Mechanismus verantwortlich ist. Obwohl die *in silico* Analyse in der humanen Promoterregion von Drosha keine Bindungsregion für FoxO1 identifizieren konnte, weist Drosha das gleiche Expressionsmuster wie Dicer nach Knockdown oder Überexpression von FoxO1 *in vitro* auf (Daten nicht gezeigt). Möglicherweise gibt es also auch hier eine direkte oder indirekte Regulation von Wachstumsfaktoren über FoxO1 auf die Expression. Um dies zu klären sind jedoch weitere Analysen notwendig.

5.2.3 Bedeutung von Dicer und Drosha *in vivo* für die Neointimaentstehung

Die bisherigen Ergebnisse zeigen eine wichtige Bedeutung der Expression von Dicer und Drosha für die Funktion von SMCs auf.

Da ein Knockdown beider Enzyme die Migration und Proliferation verstärkte, wäre eine Überexpression *in vivo* in der Theorie eine ideale Maßnahme, um die Neointimaentwicklung nach Gefäßverletzung zu inhibieren.

Zum Zeitpunkt unserer Experimente existierten jedoch keine Beschreibungen über murine oder humane Klone von Dicer oder Drosha. Auch waren diese kommerziell nicht erhältlich.

Daher wurde zunächst wieder der Ansatz eines Knockdowns gewählt.

In vivo wurde die Expression von Dicer und Drosha nach Gefäßverletzung durch Behandlung mit spezifischer siRNA gehemmt und die Neointimaentwicklung, sowie Proliferation der vaskulären Zellen im Verlauf der Restenose quantifiziert. Dieser Knockdown von Dicer und Drosha führte zu einer signifikant verstärkten Neointimaentwicklung im Vergleich zur Kontrolle. Dieser Phänotyp wurde von einer erhöhten Anzahl proliferierender Zellen im Bereich der Neointima und Media begleitet. Diese Bestätigung der *in vitro* Daten betont das mögliche Potential für einen therapeutischen Ansatz. So könnte durch eine Rekonstitution der Expression von Dicer und Drosha möglicherweise der verstärkten Proliferation von SMCs während der Restenose entgegengewirkt werden und so der pathogene Krankheitsverlauf entscheidend gebremst werden. Diese Hypothese könnte in weiteren Experimenten anhand einer (viralen) Überexpression der beiden Enzyme überprüft werden.

5.2.4 Mögliche Ursachen der zellspezifischen miRNA Expression

Viele Veröffentlichungen zeigen einen entscheidenden Einfluss der Expression von Dicer und Drosha - und somit von miRNAs - auf Zellfunktion. Trotzdem sind die zum Teil gegensätzlichen Ergebnisse auffällig und es bleibt die Frage, wie es zu den deutlichen Unterschieden in der Wirkung eines Knockdowns von Dicer in den verschiedenen Zelltypen kommt.

Zusammengenommen lassen sich diese gegensätzlichen Ergebnisse möglicherweise mit der zellspezifischen Expression von miRNAs erklären,⁷² in

deren Konsequenz sich ein globaler Knockdown natürlich auch funktionell verschieden auswirken würde.

Eine weitere Ursache, die auch die verschiedene miRNA Expressionsprofile der Zelltypen erklärt, lässt sich möglicherweise aus der Krebsforschung herleiten. Lu et al.¹¹⁵ fanden bei Untersuchungen von 217 miRNAs heraus, dass ihre Expression in verschiedenen Tumoren deutlich variierte, aber für den jeweiligen Tumor charakteristischer zu sein schien als die Expressionsmuster von 16.000 mRNAs. Angeleitet von der Rolle, die miRNAs während der Entwicklung spielen fand die Gruppe einen Zusammenhang zwischen dem jeweiligen Tumor und seiner embryonalen Herkunft. So besitzen Tumore, deren Gewebe von normalen embryonalen Vorläuferzellen stammt (aus embryonalem Entoderm), wie Magen, Darm und Leber ein ähnliches miRNA Expressionsprofil. Leukämien sind deutlich verschieden von festen Tumoren und können auch gemäß ihrer genetischen Anomalitäten unterteilt werden.

SMCs, ECs und Monozyten stammen ursprünglich aus dem Mesoderm, aber möglicherweise findet die Umstellung zur spezifischen miRNA Expression auf einer bestimmten Entwicklungsstufe statt. Ein Vergleich der miRNA Expression der verschiedenen Zelltypen der Vaskulatur im Hinblick auf ihre embryonale Entwicklung könnte möglicherweise neue Erkenntnisse über Expressions- und Funktionsweisen bringen.

5.3 Expressionsprofile von miRNAs während vaskuloproliferativer Erkrankungen *in vivo* und Expressionsregulationen infolge der wichtigsten *in vivo* auftretenden Stimuli *in vitro*

Da über die Expressionsprofile von miRNAs während vaskuloproliferativer Erkrankungen bisher noch nichts bekannt war, wurde zunächst ein Screening der miRNA Expression während der Atherosklerose und Restenose im Mausmodell durchgeführt. Dies ergab, dass die Mehrheit aller bekannten miRNAs reguliert wird, z.T. 8fach wie z.B. miR-31 und miR-494. Interessante Regulationen wurden in der real-time PCR validiert (Daten nicht gezeigt). Um zu filtern, welche Prozesse diese Regulationen verursachen und in denen diese miRNAs dann möglicherweise auch funktionell involviert sein könnten, wurde

die Expression ausgewählter *in vivo* regulierter miRNAs *in vitro* in SMCs nach Stimulation mit verschiedenen Faktoren determiniert.

Hierfür wurden mitogene, apoptotische und inflammatorische Stimuli ausgewählt, da diese während vaskuloproliferativer Erkrankungen vorherrschen. Das Cluster miR-143/145 konnte als herunterreguliert unter mitogenen und inflammatorischen Bedingungen identifiziert werden und auch nach apoptotischer Stimulation ist ein solcher Trend der Expression zu erkennen. Da miR-143/145 während der Restenose entsprechend auch deutlich verringert exprimiert wurden, zeigte sich ein Expressionsprofil, dass unter vaskuloproliferativen Bedingungen *in vitro* und *in vivo* eine herunterregulierte Expression zeigt. Da das Cluster zudem in verschiedenen Tumorzelllinien als herunterreguliert und mit anti-proliferativer Wirkung vorbeschrieben ist, wurden miR-143/145 ausgewählt um auch in vaskulären Zellen auf ihre Funktion hin untersucht zu werden. Da miR-145 zudem vornehmlich in SMCs exprimiert wird, bestünde eventuell die Möglichkeit bei einer Behandlung *in vivo* hauptsächlich die Funktionen diesen Zelltyps zu beeinflussen.

MiR-146a wurde ebenfalls zur weiteren Analyse ausgewählt. Diese miRNA weist *in vitro* sowohl eine Regulation infolge von proliferativen Stimuli als auch inflammatorischen Stimuli auf. *In vivo* scheint die hochregulierte Expression als Folge der inflammatorischen Reize während der Entstehung der Atherosklerose zu überwiegen. Diese miRNA bietet demnach möglicherweise einen Angriffspunkt für die während der Pathogenese der Atherosklerose ablaufenden inflammatorischen Prozesse mit einer zusätzlichen Wirkung auf die Proliferation.

Das miRNA-Expressionsscreening in den verschiedenen Zelltypen zeigte für miR-146a eher eine geringere Expression in SMCs und eine deutlich höhere in ECs. Trotzdem sollte aus praktischen Gründen der Zellkultur in diesem Projekt zunächst eine Relevanz dieser miRNA für SMCs abgeklärt werden. Bei *in vivo* Experimenten ist eine zellspezifische Behandlung kaum möglich, so dass die Bedeutung für die beiden mehrheitlich vorkommenden Zelltypen ECs und SMCs ohnehin wichtig abzuklären ist.

In diesem Projekt wurde sich zunächst auf miRNAs konzentriert, die in proliferativen Geschehen vorbeschrieben sind. Für die Zukunft bieten sich auf

der Basis unserer Expressions-Screenings weitere miRNAs zur weiteren Analyse an.

So ist auffällig, dass die meisten Mitglieder der let-7 Familie in SMCs und ECs sehr stark exprimiert sind. Allerdings gehörte diese miRNA-Familie zu Beginn dieses Projekts zu den mit am Besten untersuchtesten miRNAs. Schon 2005 konnte Ras als Targetgen identifiziert und in Cell veröffentlicht werden,¹¹⁶ so dass wir uns auf noch unbekanntere miRNAs konzentrieren wollten. Sicher aber wäre z.B. let-7f eine interessante miRNA, die sowohl in SMCs und ECs stark exprimiert wird und während der Atherosklerose und Restenose im Array reguliert vorgefunden wurde.

Mir-21 wird ebenfalls sehr stark exprimiert in SMCs und ECs, und deutlich reguliert im Mausmodell während der Atherosklerose und Restenose im Array, was sich auch in der real-time PCR bestätigte (relative Expression: Atherosklerose: 6 Monate: $5,7 \pm 0,9$; 12 Monate: $5,4 \pm 0,8$ / Restenose: 10 Tage: $13,6 \pm 0,2$; 21 Tage: $8,1 \pm 0,1$) (Daten nicht gezeigt).

Die Bedeutung dieser miRNA für die Restenose wurde allerdings von Ji *et al.* 2007 veröffentlicht.⁷⁸

Weiterhin für uns in Zukunft sind sicher miRNAs wie miR-31 sehr interessant. Diese miRNA wird hauptsächlich in SMCs exprimiert und ist während der Restenose deutlich hochreguliert, was auch in der real-time PCR bestätigt wurde (relative Expression: 10 Tage: $31,0 \pm 0,9$; 21 Tage: $25,5 \pm 1,0$). Neuere Publikationen zeigen jetzt ebenfalls eine Hochregulation während verschiedener Tumorentstehungen auf.¹¹⁷ Für ihre Bedeutung im vaskulären Geschehen ist bisher nichts bekannt.

Auffällig ist, dass ganze Gruppen von miRNAs wie miR-143, 145, 146a, 31 und 21 immer wieder als reguliert in verschiedenen Tumoren beschrieben werden, so dass ihnen möglicherweise eine wichtige allgemeine Bedeutung für proliferative Prozesse zugeschrieben werden kann, möglicherweise sogar unabhängig vom Zelltyp.

5.3.1 Die Expression und Funktion von miR-146a

Die Expression von miR-146a wurde während der Atherosklerose und Restenose deutlich hochreguliert. Dies ließ sich zurückzuführen auf inflammatorische Reize, die während der Pathogenese auf die SMCs wirken. Währenddessen verursachte eine mitogene Stimulation eher eine Herunterregulation der Expression. Auch in anderen chronisch inflammatorischen Erkrankungen wie der rheumatischen Arthritis oder Psoriasis ist die Expression von miR-146a deutlich erhöht.¹¹⁸⁻¹²⁰ Die hochregulierte Expression konnten gemäß Stanczyk et al.¹²⁰ auf LPS oder IL-1 β Stimulationen zurückgeführt werden, jedoch nicht TNF- α oder andere TLR-Liganden. So ist für die in Figur 15C beobachtete Hochregulation von miR-146a in SMCs wahrscheinlich die Stimulation mit IL-1 β und weniger TNF- α bzw. INF- γ verantwortlich.

Interessanterweise wird miR-146a nicht in allen chronisch inflammatorischen Geweben verstärkt exprimiert, so konnte in der Haut von Neurodermitispatienten¹¹⁹ oder Lungenbiopsien von leichten Asthmatikern¹²¹ keine Regulation beobachtet werden. Dies spricht evtl. wiederum für eine zellspezifische Expression, Regulation und möglicherweise auch Wirkungsweise dieser miRNA.

Im Rahmen der Immunantwort ist die Expressionsregulation von miR-146a schon ausführlich vorbeschrieben. So konnten Perry et al.¹²² zeigen, dass IL-1 β einen schnellen Anstieg der miR-146a Spiegel in u.a. trachealen SMCs bewirkt. Transkriptionelle Studien präsentierten NF- κ B (Nuclear Factor- κ B) als Regulator der TLR-vermittelten (Toll-like Receptor) miR-146a Expression.^{123, 124} Im Gegensatz dazu ist die Funktion von miR-146a noch relativ unbekannt. Bei hohen IL-1 β Konzentrationen inhibiert miR-146a die dadurch induzierte Ausschüttung von IL-8 und RANTES (Regulated upon Activation, Normal T-cell Expressed and Secreted), was auf eine Bedeutung während schwerer Inflammationen schließen lässt.¹²²

In Hinblick auf proliferative Erkrankungen wie Tumoren finden sich gegensätzliche Ergebnisse. So wird miR-146a hochreguliert im Papillären Schilddrüsenkarzinom,¹²⁵⁻¹²⁷ Gebärmutterhalskrebs,¹⁰³ Brustkrebs¹²⁸ und Bauchspeicheldrüsenkrebs,¹²⁸ aber herunterreguliert in Prostatakrebs.^{128, 129}

Wobei wir auch eine Runterregulation der miR-146a Expression nach Stimulation mit FCS beobachten konnten.

Über die Ursache dieser Regulationen *in vivo* wird noch spekuliert, so könnte aktiviertes NF- κ B für die erhöhte Expression von miR-146a verantwortlich gemacht werden.¹²¹ Auf der anderen Seite finden sich upstream von miR-146a im Genom mehrere Transkriptionelle Bindestellen,^{123, 124} die die Möglichkeiten weiterer Regulationsmechanismen – und somit auch Wachstumsfaktor-gesteuerte - offen lassen.

Das miR-146a nicht nur eine funktionelle Rolle in der Inflammation spielt, sondern auch pro-proliferativ wirkt konnten wir anhand eines Knockdowns in SMCs zeigen. Allerdings war dieser Effekt zwar signifikant, der Unterschied zur Kontrolle betrug aber nur wenige Prozent. In der Tumorzelllinie Hela konnte miR-146a ein stärkerer positiver Einfluss auf die Proliferation nachgewiesen werden.¹⁰³

Der relativ schwache Effekt in SMCs könnte auf die relativ niedrige Expression von miR-146a zurückgeführt werden, so dass ein Knockdown möglicherweise nur schwache Auswirkungen zeigen konnte. Zudem wird die miRNA unter proliferativen Bedingungen noch zusätzlich herunterreguliert. Dies lässt vermuten, dass bei einem Knockdown *in vivo* im Dilatationsmodell der Maus keine deutlichen direkten Effekte auf die SMCs erwartet werden können.

Zukünftige Experimente werden sich deshalb auf die funktionelle Bedeutung von miR-146a bei inflammatorischen Prozessen konzentrieren.

Unser Expressionsscreening in den verschiedenen Zelltypen zeigte, dass miR-146a besonders stark in ECs exprimiert wird. Da gerade ECs eine wichtige Rolle für die Initiierung inflammatorischer Prozesse im Verlauf vaskuloproliferativer Erkrankungen inne haben, besitzt miR-146a möglicherweise in diesem Zelltyp einen größeren funktionellen Einfluss.

5.3.2 Die Expression und Funktion von miR-143/145

Das miRNA-Cluster miR-143/145 wurde während der Restenose im Mausmodell signifikant herunterreguliert vorgefunden. Bei der Restenose steht die Proliferation der SMCs neben inflammatorischen Prozessen im

Vordergrund. Dementsprechend wurden beide miRNAs auch nach mitogener Stimulation in SMCs herunterreguliert aufgefunden und auch inflammatorische Stimuli führten bei miR-143 zu einer deutlichen Herunterregulation. Bei miR-145 zeigte sich ebenfalls dieser Trend.

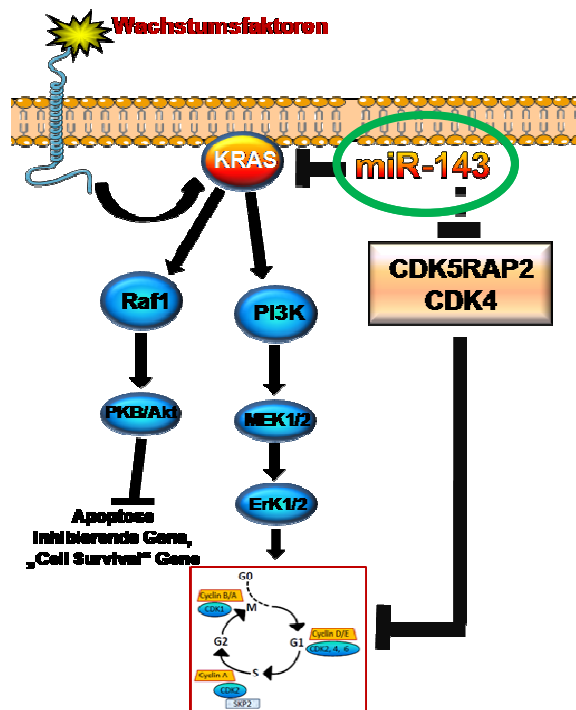
Andere proliferative Pathogenesen weisen ein ähnliches Bild auf. So sind miR-143/145 auch in verschiedenen humanen Tumorzelllinien aus Gehirn, Leber, Prostata, Darm und myeloischer Leukämie, sowie im humanen Kolorektaltumor herunterreguliert¹³⁰ und wurden daher als mögliche Tumormarker postuliert. In DLD-1 und SW480 Zellen führte ebenfalls eine Transfektion mit miR-143 und -145 Precursoren zu einer verringerten Proliferation.¹³⁰ Esau et al.¹³¹ entdeckten eine Bedeutung von miR-143 für die Differenzierung von Adipocyten, so wird ihre Differenzierung durch einen Knockdown von miR-143

inhibiert. Als direktes Target für miR-143 konnte das Onkogen KRAS validiert werden.¹³²

KRAS, eine GTPase, reguliert eine Vielzahl zellulärer Funktionen, wie z.B. Wachstum, Zelldifferenzierung und Apoptose.

Eine erhöhte Expression von miR-143 resultiert in einer verringerten Translation von KRAS, Dadurch verhindert es die durch mitogene Stimulation hervorgerufene Aktivierung des PI3K/Akt-Signalweges.

In vorhergegangenen Arbeiten unserer Arbeitsgruppe konnte gezeigt werden, dass sowohl der MAPK- als auch der PI3K/Akt-Signalweg für die Proliferation von SMCs essentiell sind.¹³³ Dieser Mechanismus könnte möglicherweise die Ursache der antiproliferativen Wirkung von miR-143 sein. Zudem würde der Signalweg über KRAS auch die leicht erhöhte Apoptoserate in SMCs nach Transfektion mit miR-143 Precursoren erklären können.



unktionelle Bedeutung
: KRAS Signalkaskade

Für miR-145 konnte bisher noch kein Target validiert werden. Unsere Daten des PCR Arrays weisen einige weitere mögliche Targets aus. So wurden einige Gene nach Überexpression von miR-143 und -145 in ihrer Expression inhibiert. Es bleibt allerdings zu klären, ob miR-145 hier einen direkten oder indirekten Effekt auf die Genexpression besitzt. Für miR-143 fanden sich durch Abgleich mit Datenbanken für die theoretische Berechnung von miRNA Targets (PicTar, TargetScan, mirBase) drei Überschneidungen mit herunterregulierten Genen. CDK5RAP2, CDK4 und RB1 zählen zu möglichen Targets von miR-143 und zeigen auch experimentell eine Runterregulation nach Transfektion mit miR-143 Precursorn. Die Funktionen dieser Gene sind allerdings gegensätzlich. Während RB1 zu den Tumorsuppressorgenen zählt und antiproliferativ wirkt,¹³⁴ zählen CDK5RAP2 und CDK4 zu den proliferativen Genen. CDK4 ist wichtig für die Zellzyklusprogression während der G1-Phase,¹³⁵ CDK5RAP2 spielt eine Rolle während G2 Phase und dem Übergang zur M-Phase.

Es bleibt zu klären, ob es sich bei diesen Genen um direkte Targets der miRNA handelt oder die beobachteten Regulationen eine Folge der inhibierten Expression von upstream wirkenden Genen ist. Eine parallele Regulation würde die These stützen, dass miRNAs das funktionelle Geschehen einer Zelle, hier im Hinblick auf Zellzyklusprogression, ganzheitlich regulieren können.

So ist Ras auch für die Aktivierung von CDK4 verantwortlich, was einen funktionellen Zusammenhang darstellen könnte.¹³⁶

Generell scheint das Cluster miR-143/5 in stark proliferativen Geschehen verringert exprimiert zu werden und ihre Expression entsprechend negativ auf die Proliferation einzuwirken.

Interessanterweise, wurde miR-143 in humanem Gewebe am stärksten im Herzen, in den Nieren und im Thymus exprimiert aufgefunden.¹³¹

Im Gegensatz zur Restenose ist miR-143 während der Atherosklerose hochreguliert und auch miR-145 wird nach 6 Monaten deutlich erhöht exprimiert, die Expression geht aber nach 12 Monaten auf fast Null zurück. Diese Ergebnisse lassen sich mit bisherigen Daten nicht erklären und bedürfen weiterer Experimente.

5.5 Ausblick

Mit unseren Experimenten konnten wir erstmals zeigen, dass Dicer und Drosha - und somit miRNAs – eine Schlüsselrolle für SMCs im Hinblick auf vaskuloproliferative Erkrankungen inne haben.

Besonders über Drosha war wenig bekannt, obwohl dieses Enzym einen entscheidenden funktionellen Einfluss besitzt und spezifisch während der miRNA-Synthese wirkt. Dicer betreffend gab es bereits einige Veröffentlichungen über die Expressionsregulation und Funktion in ECs. Überraschenderweise stehen diese zumeist im Gegensatz zu unseren Ergebnissen in SMCs. Eine solche konträre Wirkungsweise wäre in der klinischen Situation aber sehr willkommen. Ein entscheidendes Problem während der Behandlung der Restenose ist, dass auf der einen Seite die Proliferation der SMCs inhibiert werden soll, um die Entwicklung einer Neointima zu verhindern, auf der anderen Seite soll dagegen die Reendothelialisierung des Gefäßes nicht beeinträchtigt, bzw gefördert werden. Unsere Ergebnisse lassen daher einen ggf. doppelt positiv wirkenden Effekt bei einer eventuellen therapeutischen Beeinflussung vermuten.

Ein weiterer Ansatz für die Behandlung vaskuloproliferativer Erkrankungen besteht in der Identifikation einer oder einer Gruppe von miRNAs die die Funktion der Zellen der Gefäßwand entscheidend beeinflussen könnten. Von potentiellen Kandidaten wie miR-143/145 und miR-146a konnte von uns *in vitro* eine antiproliferative Wirkung nachgewiesen werden. Zusätzlich konnte eine Methode etabliert werden, mittels der lokal miRNA-Precursor und miRNA-Inhibitoren *in vivo* in Zellen der Gefäßwand transfiziert werden können. Dies stellt für die Zukunft eine wichtige Methode dar, um die Wirksamkeit einzelner miRNAs *in vivo* und somit die Möglichkeit eines therapeutischen Ansatzes zu untersuchen.

Zusätzlich wäre es interessant zu untersuchen, ob miR-146a das Potential besitzt auch inflammatorische Prozesse zu inhibieren und so die beiden wichtigsten Prozesse während des Gefäßremodelings, die Inflammation und die Proliferation hemmen könnte. Hier werden weitere Experimente folgen.

Ein weiteres wichtiges Ziel wird es in Zukunft sein, miRNA Targets zu identifizieren und validieren, um neue mögliche miRNA-basierte Therapien überhaupt entwickeln zu können.

In der Vergangenheit wurden mehrere bioinformatischen Vorhersagemodelle entwickelt, um potentielle Targetstrukturen von miRNAs zu identifizieren (Mirbase, TargetScan, PicTar, u.a.).

Aufgrund der sehr kurzen Sequenz von miRNAs und besonders weil nur die ca. 6 Nukleotide des „seed“-Sequenz entscheidend für die Target-Bindung sind, ergeben diese Programme für einzelne miRNAs eine Vielzahl von Targets an, so dass eine Validierung mittels molekularbiologischer Assays unumgänglich ist. Nur so kann die jeweilige Funktion vollständig aufgeklärt und das diagnostische bzw. therapeutische Potential und auch Risiko von miRNAs abgeschätzt werden.

Die Tatsache, dass miRNAs nicht nur einzelne Gene, sondern ganze Gen-Netzwerke und Signalwege regulieren können, bietet enorme therapeutische Möglichkeiten. Es ermöglicht durch Modulation einer einzelnen miRNA die Beeinflussung einer ganzen Gruppe von Genen. Da in verschiedenen Zellen/Organen die Verfügbarkeit potentiell regulierbarer messenger RNAs unterschiedlich sein kann, wären zellspezifische Effekte von miRNAs möglich. Wichtige zukünftige Aufgaben umfassen daher eine detaillierte Analyse von miRNA-zellspezifischen Target-Netzwerken.

6.1 Zusammenfassung

Die Apoptose, Migration und besonders die Proliferation von glatten Gefäßmuskelzellen (SMCs) spielt in vaskuloproliferativen Erkrankungen wie der Atherosklerose und Restenose eine entscheidende Rolle.

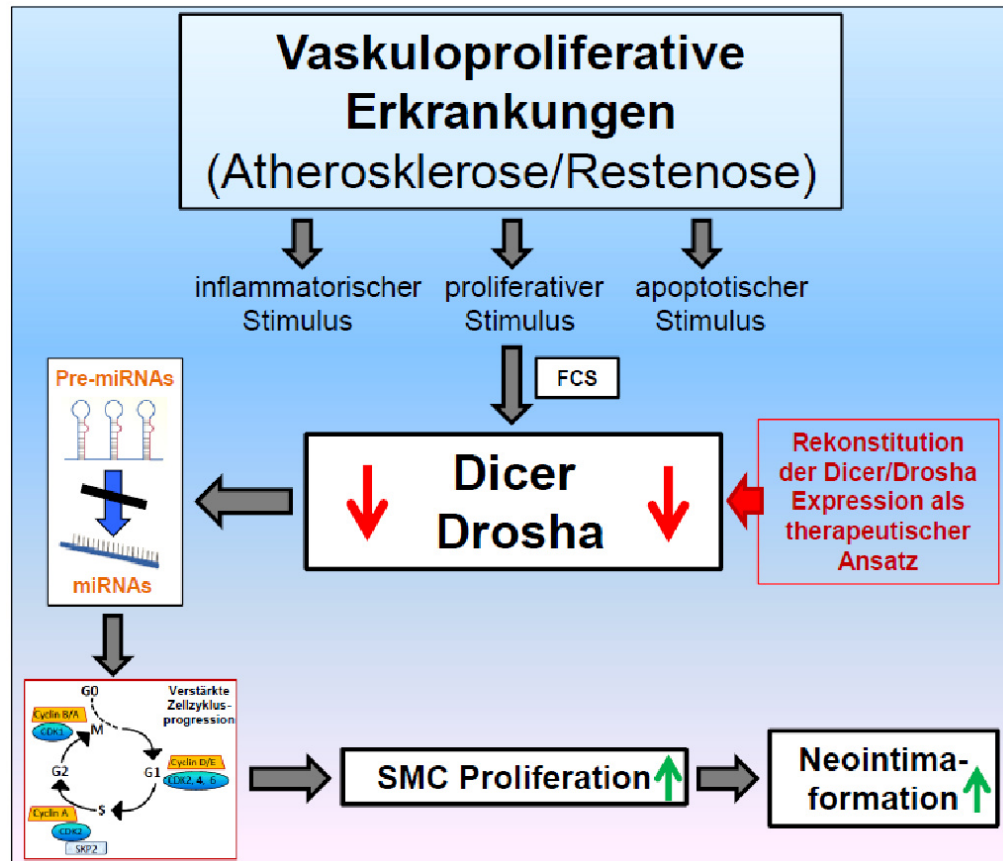
Ziel der vorliegenden Arbeit war die genaue Untersuchung der Rolle von miRNAs innerhalb dieser Prozesse.

MiRNAs sind kleine, einzelsträngige RNA Moleküle, welche die Genexpression durch Bindung an die mRNA von Zielgenen und die darauffolgende Degradierung der mRNA oder Repression der Translation regulieren. Die miRNA-prozessierenden Enzyme Dicer und Drosha sind während der Atherosklerose und während der Restenose im Tiermodell signifikant vermindert exprimiert. Eine Inhibierung der Expression der beiden Enzyme in SMCs führte zu einer Dysregulation der miRNA Expression und einer signifikanten Verstärkung der Proliferation und auch Migration *in vitro*, wohingegen kein Effekt auf Apoptose detektierbar war. Als mögliche Ursache für diesen pro-proliferativen Effekt konnte die Hochregulation einiger Zellzyklusgene (SKP2, CDK6, CDK2, DDX11) identifiziert werden.

Für die *in vivo* beobachtete Expressionsregulation von Dicer und Drosha konnte ebenfalls ein Mechanismus aufgeklärt werden. So bindet der FoxO1 Transkriptionsfaktor unter serumfreien Bedingungen an die Promoterregion von Dicer und induziert dessen Transaktivierung. Nach Stimulation mit Wachstumsfaktoren (FCS) kommt es über den PI3K/Akt-Signaltransduktionsweg zu einer Phosphorylierung und damit Inaktivierung von FoxO1, was in einer verminderten Transaktivierung und Expression von Dicer resultiert.

Die *in vitro*-Daten der verstärkten Proliferation in SMCs nach Knockdown von Dicer bzw. Drosha konnten auch *in vivo* bestätigt werden. Eine kombinierte Runterregulation von Dicer und Drosha führte im Dilatationsmodell der Maus zu einer signifikant verstärkten Neointimaentwicklung und einem erhöhten Anteil proliferierender Zellen im Bereich der Neointima und Media im Vergleich zur Kontrolle.

Zusammengefasst konnte gezeigt werden, dass die miRNA-prozessierenden Enzyme Dicer und Drosha und damit miRNAs einen bedeutenden Einfluss auf vaskuloproliferative Prozesse besitzen.



Der zweite Teil dieser Arbeit befasst sich mit der Identifizierung von miRNAs, die während der Atherosklerose bzw. Restenose reguliert werden und der weiteren Charakterisierung von miR-143, miR-145 und miR-146a.

MiR-146a wurde sowohl während der Atherosklerose als auch der Restenose im Mausmodell hochreguliert aufgefunden. Als Ursache hierfür konnten inflammatorische Reize verantwortlich gemacht werden. Eine inhibierte miR-146a Expression hat einen anti-proliferativen Effekt in SMCs.

MiR-143 und -145 bilden ein eigenständiges Cluster, d.h. sie werden gemeinsam transkribiert. Dafür spricht auch eine ähnliche Expressionsregulation. So werden beide miRNAs infolge von mitogener und auch inflammatorischer Stimulation verringert exprimiert. Auch während der Restenose im Mausmodell ist ihre Expression herunterreguliert.

Eine Transfektion mit miRNA-Precursoren führte zu einer signifikant verringerten Proliferation von SMCs *in vitro*, die sich nur deutlich abgeschwächt in Endothelzellen (ECs) wiederfand. Als mögliche Zielgene für miR-143 konnten CDK5RAP2 (Cyclin-abhängige Kinase 5 assoziierte

regulatorische Untereinheit 2), sowie CDK4 (Cyclin-abhängige Kinase 4) identifiziert werden.

Zusammengefasst geben diese Daten einen deutlichen Hinweis darauf, dass miRNAs eine wichtige funktionelle Bedeutung für SMCs inne haben und ihre Beeinflussung ein vielversprechender neuer Ansatz zur Therapie vaskuloproliferativer Erkrankungen darstellen könnte.

6.2 Summary

Micro RNAs (miRNAs) are small non-coding RNA molecules that regulate gene expression on posttranscriptional level by binding their target mRNA. They are implicated to regulate mRNA levels of up to 30% of mammalian genes, comprising key regulators for cellular function. Maturation and expression of miRNAs is tightly controlled by the two processing enzymes Dicer and Drosha. Up to now, the role of miRNAs for vascular smooth muscle cell (VSMC) function remains elusive. Thus, the aim of this study was to evaluate the regulation and impact of Dicer and Drosha for smooth muscle cell function during the development of neointimal lesions *in vitro* and *in vivo* and to screen miRNA expression in this setting.

Mouse models for atherosclerosis and restenosis revealed a significant down regulation of Dicer and Drosha expression on mRNA and protein level in diseased vessels. A siRNA-mediated knock down of Dicer or Drosha in human coronary SMCs led to an accelerated cell cycle progression as determined by FACS analysis and increased VSMC proliferation, migration but not apoptosis. The pro-proliferative outcome might be originated from the upregulation of several pro-proliferative genes (CDK4, CDK6, SKP2).

For the *in vivo* observed expression pattern of Dicer a possible mechanism could be elucidated. Thus, the foxO1 transcription factor binds under serumfree conditions to its promoter region and facilitates gene expression. Upon the presence of growth factors, the PI3K/Akt pathway becomes activated; this resulted in foxO1 phosphorylation and therefore inactivation. The transcription of Dicer was stopped.

The *in vitro* data were confirmed in an *in vivo* setting. Here, a combined knock down of Dicer and Drosha entailed a significantly increased neointima formation following wire injury.

Taken together, the results indicate a tremendous influence of the miRNA-processing enzymes Dicer and Drosha on vascular proliferative processes.

The second part of this project focussed on the identification and characterisation of miRNAs that are aberrantly expressed during atherosclerosis and restenosis.

MiR-146a could be identified as upregulated during both diseases due to inflammatory stimuli. A knock down of miR-146a in SMCS revealed an anti-proliferative effect.

MiR-143 and -145 form an independent cluster and are therefore transcribed corporately. This suggests a similar expression pattern. And indeed, both miRNAs are downregulated upon mitogenic and inflammatory stimulation *in vitro*. During restenosis in murine femoral arteries, there is as well a significantly reduced expression. Transfection with a precursor of miR-143 and miR-145 led to a significantly reduced proliferation in SMCs, whereas the proliferative rate in ECs was less affected. CDK5RAP and CDK4 could be identified as possible target genes for miR-143. Both genes are downregulated following enhanced miR-143 expression and belong to *in silico* predicted target genes. Further experiments will be necessary to confirm this finding.

In summary, these data indicate that miRNAs inhibit important functions for SMCs and therefore might represent a possible target for future treatment of vascular proliferative diseases.

7. Literaturverzeichnis

1. Tunstall-Pedoe H, Kuulasmaa K, Mahonen M, Tolonen H, Ruokokoski E, Amouyel P. Contribution of trends in survival and coronary-event rates to changes in coronary heart disease mortality: 10-year results from 37 WHO MONICA project populations. Monitoring trends and determinants in cardiovascular disease. *Lancet*. 1999;353(9164):1547-1557.
2. Nobuyoshi M, Kimura T, Nosaka H, Mioka S, Ueno K, Yokoi H, Hamasaki N, Horiuchi H, Ohishi H. Restenosis after successful percutaneous transluminal coronary angioplasty: serial angiographic follow-up of 229 patients. *J Am Coll Cardiol*. 1988;12(3):616-623.
3. Serruys PW, Luijten HE, Beatt KJ, Geuskens R, de Feyter PJ, van den Brand M, Reiber JH, ten Katen HJ, van Es GA, Hugenholtz PG. Incidence of restenosis after successful coronary angioplasty: a time-related phenomenon. A quantitative angiographic study in 342 consecutive patients at 1, 2, 3, and 4 months. *Circulation*. 1988;77(2):361-371.
4. Kuntz RE, Baim DS. Prevention of coronary restenosis : the evolving evidence base for radiation therapy. *Circulation*. 2000;101(18):2130-2133.
5. Mangi AA, Dzau VJ. Gene therapy for human bypass grafts. *Ann Med*. 2001;33(3):153-155.
6. Ross R. Cell biology of atherosclerosis. *Annu Rev Physiol*. 1995;57:791-804.
7. Ross R. Atherosclerosis is an inflammatory disease. *Am Heart J*. 1999;138(5 Pt 2):S419-420.
8. Libby P, Ridker PM, Maseri A. Inflammation and atherosclerosis. *Circulation*. 2002;105(9):1135-1143.
9. Ross R, Glomset JA. Atherosclerosis and the arterial smooth muscle cell: Proliferation of smooth muscle is a key event in the genesis of the lesions of atherosclerosis. *Science*. 1973;180(93):1332-1339.
10. Schwartz SM, Virmani R, Rosenfeld ME. The good smooth muscle cells in atherosclerosis. *Curr Atheroscler Rep*. 2000;2(5):422-429.
11. Dzau VJ, Braun-Dullaeus RC, Sedding DG. Vascular proliferation and atherosclerosis: New perspectives and therapeutic strategies. *Nat Med*. 2002;8(11):1249-1256.
12. Velican C, Velican D. Coronary arteries in children up to the age of ten years II. Intimal thickening and its role in atherosclerotic involvement. *Med Interne*. 1976;14(1):17-24.
13. Scott NA, Cipolla GD, Ross CE, Dunn B, Martin FH, Simonet L, Wilcox JN. Identification of a potential role for the adventitia in vascular lesion formation after balloon overstretch injury of porcine coronary arteries. *Circulation*. 1996;93(12):2178-2187.
14. DeRuiter MC, Poelmann RE, VanMunsteren JC, Mironov V, Markwald RR, Gittenberger-de Groot AC. Embryonic endothelial cells transdifferentiate into mesenchymal cells expressing smooth muscle actins in vivo and in vitro. *Circ Res*. 1997;80(4):444-451.
15. Sata M, Saiura A, Kunisato A, Tojo A, Okada S, Tokuhisa T, Hirai H, Makuuchi M, Hirata Y, Nagai R. Hematopoietic stem cells differentiate into vascular cells that participate in the pathogenesis of atherosclerosis. *Nat Med*. 2002;8(4):403-409.
16. Hillebrands JL, Klatter FA, van den Hurk BM, Popa ER, Nieuwenhuis P, Rozing J. Origin of neointimal endothelium and alpha-actin-positive smooth

- muscle cells in transplant arteriosclerosis. *J Clin Invest.* 2001;107(11):1411-1422.
17. Campbell JH, Han CL, Campbell GR. Neointimal formation by circulating bone marrow cells. *Ann N Y Acad Sci.* 2001;947:18-24; discussion 24-15.
 18. Shimizu K, Sugiyama S, Aikawa M, Fukumoto Y, Rabkin E, Libby P, Mitchell RN. Host bone-marrow cells are a source of donor intimal smooth- muscle-like cells in murine aortic transplant arteriopathy. *Nat Med.* 2001;7(6):738-741.
 19. Simper D, Stalboerger PG, Panetta CJ, Wang S, Caplice NM. Smooth muscle progenitor cells in human blood. *Circulation.* 2002;106(10):1199-1204.
 20. Fuster V, Lewis A. Conner Memorial Lecture. Mechanisms leading to myocardial infarction: insights from studies of vascular biology. *Circulation.* 1994;90(4):2126-2146.
 21. Glagov S, Weisenberg E, Zarins CK, Stankunavicius R, Kolettis GJ. Compensatory enlargement of human atherosclerotic coronary arteries. *N Engl J Med.* 1987;316(22):1371-1375.
 22. Gibbons GH, Dzau VJ. The emerging concept of vascular remodeling. *N Engl J Med.* 1994;330(20):1431-1438.
 23. Forrester JS, Fishbein M, Helfant R, Fagin J. A paradigm for restenosis based on cell biology: clues for the development of new preventive therapies. *J Am Coll Cardiol.* 1991;17(3):758-769.
 24. Riessen R, Isner JM, Blessing E, Loushin C, Nikol S, Wight TN. Regional differences in the distribution of the proteoglycans biglycan and decorin in the extracellular matrix of atherosclerotic and restenotic human coronary arteries. *Am J Pathol.* 1994;144(5):962-974.
 25. Schwartz RS, Huber KC, Murphy JG, Edwards WD, Camrud AR, Vlietstra RE, Holmes DR. Restenosis and the proportional neointimal response to coronary artery injury: results in a porcine model. *J Am Coll Cardiol.* 1992;19(2):267-274.
 26. Strauss BH, Robinson R, Batchelor WB, Chisholm RJ, Ravi G, Natarajan MK, Logan RA, Mehta SR, Levy DE, Ezrin AM, Keeley FW. In vivo collagen turnover following experimental balloon angioplasty injury and the role of matrix metalloproteinases. *Circ Res.* 1996;79(3):541-550.
 27. Bauters C, Marotte F, Hamon M, Oliviero P, Farhadian F, Robert V, Samuel JL, Rappaport L. Accumulation of fetal fibronectin mRNAs after balloon denudation of rabbit arteries. *Circulation.* 1995;92(4):904-911.
 28. Farb A, Kolodgie FD, Hwang JY, Burke AP, Tefera K, Weber DK, Wight TN, Virmani R. Extracellular matrix changes in stented human coronary arteries. *Circulation.* 2004;110(8):940-947.
 29. Teirstein PS, Massullo V, Jani S, Popma JJ, Mintz GS, Russo RJ, Schatz RA, Guarneri EM, Steuterman S, Morris NB, Leon MB, Tripuraneni P. Catheter-based radiotherapy to inhibit restenosis after coronary stenting. *N Engl J Med.* 1997;336(24):1697-1703.
 30. Leon MB, Baim DS, Popma JJ, Gordon PC, Cutlip DE, Ho KK, Giambartolomei A, Diver DJ, Lasorda DM, Williams DO, Pocock SJ, Kuntz RE. A clinical trial comparing three antithrombotic-drug regimens after coronary-artery stenting. Stent Anticoagulation Restenosis Study Investigators. *N Engl J Med.* 1998;339(23):1665-1671.
 31. Costa MA, Sabat M, van der Giessen WJ, Kay IP, Cervinka P, Ligthart JM, Serrano P, Coen VL, Levendag PC, Serruys PW. Late coronary occlusion after intracoronary brachytherapy. *Circulation.* 1999;100(8):789-792.

32. Liistro F, Stankovic G, Di Mario C, Takagi T, Chieffo A, Moshiri S, Montorfano M, Carlino M, Briguori C, Pagnotta P, Albiero R, Corvaja N, Colombo A. First clinical experience with a paclitaxel derivate-eluting polymer stent system implantation for in-stent restenosis: immediate and long-term clinical and angiographic outcome. *Circulation*. 2002;105(16):1883-1886.
33. Ruef J, Meshel AS, Hu Z, Horaist C, Ballinger CA, Thompson LJ, Subbarao VD, Dumont JA, Patterson C. Flavopiridol inhibits smooth muscle cell proliferation in vitro and neointimal formation In vivo after carotid injury in the rat. *Circulation*. 1999;100(6):659-665.
34. Brooks EE, Gray NS, Joly A, Kerwar SS, Lum R, Mackman RL, Norman TC, Rosete J, Rowe M, Schow SR, Schultz PG, Wang X, Wick MM, Shiffman D. CVT-313, a specific and potent inhibitor of CDK2 that prevents neointimal proliferation. *J Biol Chem*. 1997;272(46):29207-29211.
35. Morice MC, Serruys PW, Sousa JE, Fajadet J, Ban Hayashi E, Perin M, Colombo A, Schuler G, Barragan P, Guagliumi G, Molnar F, Falotico R. A randomized comparison of a sirolimus-eluting stent with a standard stent for coronary revascularization. *N Engl J Med*. 2002;346(23):1773-1780.
36. Mauri L, Silbaugh TS, Wolf RE, Zelevinsky K, Lovett A, Zhou Z, Resnic FS, Normand SL. Long-term clinical outcomes after drug-eluting and bare-metal stenting in Massachusetts. *Circulation*. 2008;118(18):1817-1827.
37. Mann MJ, Whittemore AD, Donaldson MC, Belkin M, Conte MS, Polak JF, Orav EJ, Ehsan A, Dell'Acqua G, Dzau VJ. Ex-vivo gene therapy of human vascular bypass grafts with E2F decoy: the PREVENT single-centre, randomised, controlled trial. *Lancet*. 1999;354(9189):1493-1498.
38. Lim LP, Lau NC, Garrett-Engele P, Grimson A, Schelter JM, Castle J, Bartel DP, Linsley PS, Johnson JM. Microarray analysis shows that some microRNAs downregulate large numbers of target mRNAs. *Nature*. 2005;433(7027):769-773.
39. Lu J, Shen Y, Wu Q, Kumar S, He B, Shi S, Carthew RW, Wang SM, Wu CI. The birth and death of microRNA genes in Drosophila. *Nat Genet*. 2008;40(3):351-355.
40. Bartel DP. MicroRNAs: genomics, biogenesis, mechanism, and function. *Cell*. 2004;116(2):281-297.
41. Ambros V. MicroRNA pathways in flies and worms: growth, death, fat, stress, and timing. *Cell*. 2003;113(6):673-676.
42. Du T, Zamore PD. microPrimer: the biogenesis and function of microRNA. *Development*. 2005;132(21):4645-4652.
43. Chen CZ. MicroRNAs as oncogenes and tumor suppressors. *N Engl J Med*. 2005;353(17):1768-1771.
44. Krutzfeldt J, Rajewsky N, Braich R, Rajeev KG, Tuschl T, Manoharan M, Stoffel M. Silencing of microRNAs in vivo with 'antagomirs'. *Nature*. 2005;438(7068):685-689.
45. Rodriguez A, Griffiths-Jones S, Ashurst JL, Bradley A. Identification of mammalian microRNA host genes and transcription units. *Genome Res*. 2004;14(10A):1902-1910.
46. Farh KK, Grimson A, Jan C, Lewis BP, Johnston WK, Lim LP, Burge CB, Bartel DP. The widespread impact of mammalian MicroRNAs on mRNA repression and evolution. *Science*. 2005;310(5755):1817-1821.
47. Kim VN. MicroRNA biogenesis: coordinated cropping and dicing. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2005;6(5):376-385.

48. Cai X, Hagedorn CH, Cullen BR. Human microRNAs are processed from capped, polyadenylated transcripts that can also function as mRNAs. *Rna*. 2004;10(12):1957-1966.
49. Lee Y, Ahn C, Han J, Choi H, Kim J, Yim J, Lee J, Provost P, Radmark O, Kim S, Kim VN. The nuclear RNase III Drosha initiates microRNA processing. *Nature*. 2003;425(6956):415-419.
50. Basyuk E, Suavet F, Doglio A, Bordonne R, Bertrand E. Human let-7 stem-loop precursors harbor features of RNase III cleavage products. *Nucleic Acids Res*. 2003;31(22):6593-6597.
51. Zamore PD. Thirty-three years later, a glimpse at the ribonuclease III active site. *Mol Cell*. 2001;8(6):1158-1160.
52. Yi R, Qin Y, Macara IG, Cullen BR. Exportin-5 mediates the nuclear export of pre-microRNAs and short hairpin RNAs. *Genes Dev*. 2003;17(24):3011-3016.
53. Bohnsack MT, Czaplinski K, Gorlich D. Exportin 5 is a RanGTP-dependent dsRNA-binding protein that mediates nuclear export of pre-miRNAs. *Rna*. 2004;10(2):185-191.
54. Chendrimada TP, Gregory RI, Kumaraswamy E, Norman J, Cooch N, Nishikura K, Shiekhattar R. TRBP recruits the Dicer complex to Ago2 for microRNA processing and gene silencing. *Nature*. 2005;436(7051):740-744.
55. Lee Y, Hur I, Park SY, Kim YK, Suh MR, Kim VN. The role of PACT in the RNA silencing pathway. *Embo J*. 2006;25(3):522-532.
56. Hutvagner G, McLachlan J, Pasquinelli AE, Balint E, Tuschl T, Zamore PD. A cellular function for the RNA-interference enzyme Dicer in the maturation of the let-7 small temporal RNA. *Science*. 2001;293(5531):834-838.
57. Maniatakis E, Mourelatos Z. A human, ATP-independent, RISC assembly machine fueled by pre-miRNA. *Genes Dev*. 2005;19(24):2979-2990.
58. Hammond SM, Bernstein E, Beach D, Hannon GJ. An RNA-directed nuclease mediates post-transcriptional gene silencing in *Drosophila* cells. *Nature*. 2000;404(6775):293-296.
59. Meister G, Landthaler M, Patkaniowska A, Dorsett Y, Teng G, Tuschl T. Human Argonaute2 mediates RNA cleavage targeted by miRNAs and siRNAs. *Mol Cell*. 2004;15(2):185-197.
60. Yekta S, Shih IH, Bartel DP. MicroRNA-directed cleavage of HOXB8 mRNA. *Science*. 2004;304(5670):594-596.
61. Olsen PH, Ambros V. The lin-4 regulatory RNA controls developmental timing in *Caenorhabditis elegans* by blocking LIN-14 protein synthesis after the initiation of translation. *Dev Biol*. 1999;216(2):671-680.
62. Liu Z, Sall A, Yang D. MicroRNA: an Emerging Therapeutic Target and Intervention Tool. *Int J Mol Sci*. 2008;9(6):978-999.
63. Bernstein E, Kim SY, Carmell MA, Murchison EP, Alcorn H, Li MZ, Mills AA, Elledge SJ, Anderson KV, Hannon GJ. Dicer is essential for mouse development. *Nat Genet*. 2003;35(3):215-217.
64. O'Rourke JR, Georges SA, Seay HR, Tapscott SJ, McManus MT, Goldhamer DJ, Swanson MS, Harfe BD. Essential role for Dicer during skeletal muscle development. *Dev Biol*. 2007;311(2):359-368.
65. Zhao Y, Ransom JF, Li A, Vedantham V, von Drehle M, Muth AN, Tsuchihashi T, McManus MT, Schwartz RJ, Srivastava D. Dysregulation of cardiogenesis, cardiac conduction, and cell cycle in mice lacking miRNA-1-2. *Cell*. 2007;129(2):303-317.
66. Chen JF, Murchison EP, Tang R, Callis TE, Tatsuguchi M, Deng Z, Rojas M, Hammond SM, Schneider MD, Selzman CH, Meissner G, Patterson C, Hannon

- GJ, Wang DZ. Targeted deletion of Dicer in the heart leads to dilated cardiomyopathy and heart failure. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2008;105(6):2111-2116.
67. Yang WJ, Yang DD, Na S, Sandusky GE, Zhang Q, Zhao G. Dicer is required for embryonic angiogenesis during mouse development. *J Biol Chem*. 2005;280(10):9330-9335.
68. Giraldez AJ, Cinalli RM, Glasner ME, Enright AJ, Thomson JM, Baskerville S, Hammond SM, Bartel DP, Schier AF. MicroRNAs regulate brain morphogenesis in zebrafish. *Science*. 2005;308(5723):833-838.
69. Suarez Y, Fernandez-Hernando C, Pober JS, Sessa WC. Dicer dependent microRNAs regulate gene expression and functions in human endothelial cells. *Circ Res*. 2007;100(8):1164-1173.
70. Kuehbach A, Urbich C, Zeiher AM, Dimmeler S. Role of Dicer and Drosha for endothelial microRNA expression and angiogenesis. *Circ Res*. 2007;101(1):59-68.
71. Shilo S, Roy S, Khanna S, Sen CK. Evidence for the involvement of miRNA in redox regulated angiogenic response of human microvascular endothelial cells. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2008;28(3):471-477.
72. Lagos-Quintana M, Rauhut R, Yalcin A, Meyer J, Lendeckel W, Tuschl T. Identification of tissue-specific microRNAs from mouse. *Curr Biol*. 2002;12(9):735-739.
73. van Rooij E, Sutherland LB, Liu N, Williams AH, McAnally J, Gerard RD, Richardson JA, Olson EN. A signature pattern of stress-responsive microRNAs that can evoke cardiac hypertrophy and heart failure. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2006;103(48):18255-18260.
74. Thum T, Galuppo P, Wolf C, Fiedler J, Kneitz S, van Laake LW, Doevendans PA, Mummery CL, Borlak J, Haverich A, Gross C, Engelhardt S, Ertl G, Bauersachs J. MicroRNAs in the human heart: a clue to fetal gene reprogramming in heart failure. *Circulation*. 2007;116(3):258-267.
75. Ikeda S, Kong SW, Lu J, Bisping E, Zhang H, Allen PD, Golub TR, Pieske B, Pu WT. Altered microRNA expression in human heart disease. *Physiol Genomics*. 2007;31(3):367-373.
76. Matkovich SJ, Van Booven DJ, Youker KA, Torre-Amione G, Diwan A, Eschenbacher WH, Dorn LE, Watson MA, Margulies KB, Dorn GW, 2nd. Reciprocal regulation of myocardial microRNAs and messenger RNA in human cardiomyopathy and reversal of the microRNA signature by biomechanical support. *Circulation*. 2009;119(9):1263-1271.
77. Thum T. Cardiac dissonance without conductors: how dicer depletion provokes chaos in the heart. *Circulation*. 2008;118(15):1524-1527.
78. Ji R, Cheng Y, Yue J, Yang J, Liu X, Chen H, Dean DB, Zhang C. MicroRNA expression signature and antisense-mediated depletion reveal an essential role of MicroRNA in vascular neointimal lesion formation. *Circ Res*. 2007;100(11):1579-1588.
79. Harris TA, Yamakuchi M, Ferlito M, Mendell JT, Lowenstein CJ. MicroRNA-126 regulates endothelial expression of vascular cell adhesion molecule 1. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2008;105(5):1516-1521.
80. Martin MM, Buckenberger JA, Jiang J, Malana GE, Nuovo GJ, Chotani M, Feldman DS, Schmittgen TD, Elton TS. The human angiotensin II type 1 receptor +1166 A/C polymorphism attenuates microRNA-155 binding. *J Biol Chem*. 2007;282(33):24262-24269.

81. Mitani K, Wakamiya M, Hasty P, Graham FL, Bradley A, Caskey CT. Gene targeting in mouse embryonic stem cells with an adenoviral vector. *Somat Cell Mol Genet.* 1995;21(4):221-231.
82. Hitt MM, Addison CL, Graham FL. Human adenovirus vectors for gene transfer into mammalian cells. *Adv Pharmacol.* 1997;40:137-206.
83. Graham FL, Prevec L. Methods for construction of adenovirus vectors. *Mol Biotechnol.* 1995;3(3):207-220.
84. Chartier C, Degryse E, Gantzer M, Dieterle A, Pavirani A, Mehtali M. Efficient generation of recombinant adenovirus vectors by homologous recombination in *Escherichia coli*. *J Virol.* 1996;70(7):4805-4810.
85. Grable M, Hearing P. cis and trans requirements for the selective packaging of adenovirus type 5 DNA. *J Virol.* 1992;66(2):723-731.
86. Graham FL, Smiley J, Russell WC, Nairn R. Characteristics of a human cell line transformed by DNA from human adenovirus type 5. *J Gen Virol.* 1977;36(1):59-74.
87. Kumar MS, Lu J, Mercer KL, Golub TR, Jacks T. Impaired microRNA processing enhances cellular transformation and tumorigenesis. *Nat Genet.* 2007;39(5):673-677.
88. Amann J, Kidd VJ, Lahti JM. Characterization of putative human homologues of the yeast chromosome transmission fidelity gene, CHL1. *J Biol Chem.* 1997;272(6):3823-3832.
89. Christensen KL, Patrick AN, McCoy EL, Ford HL. The six family of homeobox genes in development and cancer. *Adv Cancer Res.* 2008;101:93-126.
90. Cobos I, Borello U, Rubenstein JL. Dlx transcription factors promote migration through repression of axon and dendrite growth. *Neuron.* 2007;54(6):873-888.
91. Chen YN, Chen H, Xu Y, Zhang X, Luo Y. Expression of pituitary homeobox 1 gene in human gastric carcinogenesis and its clinicopathological significance. *World J Gastroenterol.* 2008;14(2):292-297.
92. Niwa H, Miyazaki J, Smith AG. Quantitative expression of Oct-3/4 defines differentiation, dedifferentiation or self-renewal of ES cells. *Nat Genet.* 2000;24(4):372-376.
93. Alanentalo T, Chatonnet F, Karlen M, Sulniute R, Ericson J, Andersson E, Ahlgren U. Cloning and analysis of Nkx6.3 during CNS and gastrointestinal development. *Gene Expr Patterns.* 2006;6(2):162-170.
94. Balmer JE, Blomhoff R. Gene expression regulation by retinoic acid. *J Lipid Res.* 2002;43(11):1773-1808.
95. Nakamura N, Ramaswamy S, Vazquez F, Signoretti S, Loda M, Sellers WR. Forkhead transcription factors are critical effectors of cell death and cell cycle arrest downstream of PTEN. *Mol Cell Biol.* 2000;20(23):8969-8982.
96. Kops GJ, Medema RH, Glassford J, Essers MA, Dijkers PF, Coffey PJ, Lam EW, Burgering BM. Control of cell cycle exit and entry by protein kinase B-regulated forkhead transcription factors. *Mol Cell Biol.* 2002;22(7):2025-2036.
97. Sedding DG, Seay U, Fink L, Heil M, Kummer W, Tillmanns H, Braun-Dullaeus RC. Mechanosensitive p27Kip1 regulation and cell cycle entry in vascular smooth muscle cells. *Circulation.* 2003;108(5):616-622.
98. Ota A, Tagawa H, Karnan S, Tsuzuki S, Karpas A, Kira S, Yoshida Y, Seto M. Identification and characterization of a novel gene, C13orf25, as a target for 13q31-q32 amplification in malignant lymphoma. *Cancer Res.* 2004;64(9):3087-3095.
99. Hayashita Y, Osada H, Tatematsu Y, Yamada H, Yanagisawa K, Tomida S, Yatabe Y, Kawahara K, Sekido Y, Takahashi T. A polycistronic microRNA

- cluster, miR-17-92, is overexpressed in human lung cancers and enhances cell proliferation. *Cancer Res.* 2005;65(21):9628-9632.
100. Dews M, Homayouni A, Yu D, Murphy D, Sevignani C, Wentzel E, Furth EE, Lee WM, Enders GH, Mendell JT, Thomas-Tikhonenko A. Augmentation of tumor angiogenesis by a Myc-activated microRNA cluster. *Nat Genet.* 2006;38(9):1060-1065.
101. Koelle MR, Horvitz HR. EGL-10 regulates G protein signaling in the *C. elegans* nervous system and shares a conserved domain with many mammalian proteins. *Cell.* 1996;84(1):115-125.
102. Murphy JJ, Norton JD. Cell-type-specific early response gene expression during plasmacytoid differentiation of human B lymphocytic leukemia cells. *Biochim Biophys Acta.* 1990;1049(3):261-271.
103. Wang X, Tang S, Le SY, Lu R, Rader JS, Meyers C, Zheng ZM. Aberrant expression of oncogenic and tumor-suppressive microRNAs in cervical cancer is required for cancer cell growth. *PLoS ONE.* 2008;3(7):e2557.
104. Elmen J, Lindow M, Schutz S, Lawrence M, Petri A, Obad S, Lindholm M, Hedtjarn M, Hansen HF, Berger U, Gullans S, Kearney P, Sarnow P, Straarup EM, Kauppinen S. LNA-mediated microRNA silencing in non-human primates. *Nature.* 2008;452(7189):896-899.
105. Sata M, Maejima Y, Adachi F, Fukino K, Saiura A, Sugiura S, Aoyagi T, Imai Y, Kurihara H, Kimura K, Omata M, Makuuchi M, Hirata Y, Nagai R. A mouse model of vascular injury that induces rapid onset of medial cell apoptosis followed by reproducible neointimal hyperplasia. *J Mol Cell Cardiol.* 2000;32(11):2097-2104.
106. Lindner V, Fingerle J, Reidy MA. Mouse model of arterial injury. *Circ Res.* 1993;73(5):792-796.
107. Kumar A, Lindner V. Remodeling with neointima formation in the mouse carotid artery after cessation of blood flow. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 1997;17(10):2238-2244.
108. Carmeliet P, Moons L, Collen D. Mouse models of angiogenesis, arterial stenosis, atherosclerosis and hemostasis. *Cardiovasc Res.* 1998;39(1):8-33.
109. Iafrazi MD, Karas RH, Aronovitz M, Kim S, Sullivan TR, Jr., Lubahn DB, O'Donnell TF, Jr., Korach KS, Mendelsohn ME. Estrogen inhibits the vascular injury response in estrogen receptor alpha-deficient mice. *Nat Med.* 1997;3(5):545-548.
110. Nakashima Y, Plump AS, Raines EW, Breslow JL, Ross R. ApoE-deficient mice develop lesions of all phases of atherosclerosis throughout the arterial tree. *Arterioscler Thromb.* 1994;14(1):133-140.
111. Ishibashi S, Herz J, Maeda N, Goldstein JL, Brown MS. The two-receptor model of lipoprotein clearance: tests of the hypothesis in "knockout" mice lacking the low density lipoprotein receptor, apolipoprotein E, or both proteins. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1994;91(10):4431-4435.
112. Bonthu S, Heistad DD, Chappell DA, Lamping KG, Faraci FM. Atherosclerosis, vascular remodeling, and impairment of endothelium-dependent relaxation in genetically altered hyperlipidemic mice. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 1997;17(11):2333-2340.
113. Asada S, Takahashi T, Isodono K, Adachi A, Imoto H, Ogata T, Ueyama T, Matsubara H, Oh H. Downregulation of Dicer expression by serum withdrawal sensitizes human endothelial cells to apoptosis. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2008;295(6):H2512-2521.

114. Tokumaru S, Suzuki M, Yamada H, Nagino M, Takahashi T. let-7 regulates Dicer expression and constitutes a negative feedback loop. *Carcinogenesis*. 2008;29(11):2073-2077.
115. Lu J, Getz G, Miska EA, Alvarez-Saavedra E, Lamb J, Peck D, Sweet-Cordero A, Ebert BL, Mak RH, Ferrando AA, Downing JR, Jacks T, Horvitz HR, Golub TR. MicroRNA expression profiles classify human cancers. *Nature*. 2005;435(7043):834-838.
116. Johnson SM, Grosshans H, Shingara J, Byrom M, Jarvis R, Cheng A, Labourier E, Reinert KL, Brown D, Slack FJ. RAS is regulated by the let-7 microRNA family. *Cell*. 2005;120(5):635-647.
117. Slaby O, Svoboda M, Fabian P, Smerdova T, Knoflickova D, Bednarikova M, Nenutil R, Vyzula R. Altered expression of miR-21, miR-31, miR-143 and miR-145 is related to clinicopathologic features of colorectal cancer. *Oncology*. 2007;72(5-6):397-402.
118. Nakasa T, Miyaki S, Okubo A, Hashimoto M, Nishida K, Ochi M, Asahara H. Expression of microRNA-146 in rheumatoid arthritis synovial tissue. *Arthritis Rheum*. 2008;58(5):1284-1292.
119. Sonkoly E, Wei T, Janson PC, Saaf A, Lundeberg L, Tengvall-Linder M, Norstedt G, Alenius H, Homey B, Scheynius A, Stahle M, Pivarsci A. MicroRNAs: novel regulators involved in the pathogenesis of Psoriasis? *PLoS ONE*. 2007;2(7):e610.
120. Stanczyk J, Pedrioli DM, Brentano F, Sanchez-Pernaute O, Kolling C, Gay RE, Detmar M, Gay S, Kyburz D. Altered expression of MicroRNA in synovial fibroblasts and synovial tissue in rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum*. 2008;58(4):1001-1009.
121. Williams AE, Perry MM, Moschos SA, Larner-Svensson HM, Lindsay MA. Role of miRNA-146a in the regulation of the innate immune response and cancer. *Biochem Soc Trans*. 2008;36(Pt 6):1211-1215.
122. Perry MM, Moschos SA, Williams AE, Shepherd NJ, Larner-Svensson HM, Lindsay MA. Rapid changes in microRNA-146a expression negatively regulate the IL-1beta-induced inflammatory response in human lung alveolar epithelial cells. *J Immunol*. 2008;180(8):5689-5698.
123. Taganov KD, Boldin MP, Chang KJ, Baltimore D. NF-kappaB-dependent induction of microRNA miR-146, an inhibitor targeted to signaling proteins of innate immune responses. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2006;103(33):12481-12486.
124. Cameron JE, Yin Q, Fewell C, Lacey M, McBride J, Wang X, Lin Z, Schaefer BC, Flemington EK. Epstein-Barr virus latent membrane protein 1 induces cellular MicroRNA miR-146a, a modulator of lymphocyte signaling pathways. *J Virol*. 2008;82(4):1946-1958.
125. Jazdzewski K, Murray EL, Franssila K, Jarzab B, Schoenberg DR, de la Chapelle A. Common SNP in pre-miR-146a decreases mature miR expression and predisposes to papillary thyroid carcinoma. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2008;105(20):7269-7274.
126. He H, Jazdzewski K, Li W, Liyanarachchi S, Nagy R, Volinia S, Calin GA, Liu CG, Franssila K, Suster S, Kloos RT, Croce CM, de la Chapelle A. The role of microRNA genes in papillary thyroid carcinoma. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2005;102(52):19075-19080.
127. Pallante P, Visone R, Ferracin M, Ferraro A, Berlingieri MT, Troncone G, Chiappetta G, Liu CG, Santoro M, Negrini M, Croce CM, Fusco A. MicroRNA

- deregulation in human thyroid papillary carcinomas. *Endocr Relat Cancer*. 2006;13(2):497-508.
128. Volinia S, Calin GA, Liu CG, Ambs S, Cimmino A, Petrocca F, Visone R, Iorio M, Roldo C, Ferracin M, Prueitt RL, Yanaihara N, Lanza G, Scarpa A, Vecchione A, Negrini M, Harris CC, Croce CM. A microRNA expression signature of human solid tumors defines cancer gene targets. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2006;103(7):2257-2261.
129. Lin SL, Chiang A, Chang D, Ying SY. Loss of mir-146a function in hormone-refractory prostate cancer. *Rna*. 2008;14(3):417-424.
130. Akao Y, Nakagawa Y, Naoe T. MicroRNAs 143 and 145 are possible common onco-microRNAs in human cancers. *Oncol Rep*. 2006;16(4):845-850.
131. Esau C, Kang X, Peralta E, Hanson E, Marcusson EG, Ravichandran LV, Sun Y, Koo S, Perera RJ, Jain R, Dean NM, Freier SM, Bennett CF, Lollo B, Griffey R. MicroRNA-143 regulates adipocyte differentiation. *J Biol Chem*. 2004;279(50):52361-52365.
132. Chen X, Guo X, Zhang H, Xiang Y, Chen J, Yin Y, Cai X, Wang K, Wang G, Ba Y, Zhu L, Wang J, Yang R, Zhang Y, Ren Z, Zen K, Zhang J, Zhang CY. Role of miR-143 targeting KRAS in colorectal tumorigenesis. *Oncogene*. 2009;28(10):1385-1392.
133. Braun-Dullaeus RC, Mann MJ, Dzau VJ. Cell cycle progression: new therapeutic target for vascular proliferative disease. *Circulation*. 1998;98(1):82-89.
134. Murphree AL, Benedict WF. Retinoblastoma: clues to human oncogenesis. *Science*. 1984;223(4640):1028-1033.
135. Tam SW, Theodoras AM, Shay JW, Draetta GF, Pagano M. Differential expression and regulation of Cyclin D1 protein in normal and tumor human cells: association with Cdk4 is required for Cyclin D1 function in G1 progression. *Oncogene*. 1994;9(9):2663-2674.
136. Aktas H, Cai H, Cooper GM. Ras links growth factor signaling to the cell cycle machinery via regulation of cyclin D1 and the Cdk inhibitor p27KIP1. *Mol Cell Biol*. 1997;17(7):3850-3857.

8. Abkürzungsverzeichnis

µg	Mikrogramm
µM	Mikromol
A.	Arterie
Abb.	Abbildung
apoE	Apolipoprotein E
BM	Basal Medium
bFGF	basic fibroblast growth factor
bzw.	beziehungsweise
Cdk	Cyclin dependent kinase
DNA	Desoxyribonukleinsäure
EC	Endothelzellen
FCS	Fötale Kälberserum
FoxO	Forkhead Transkriptionsfaktoren
GM	Growth Medium
HBOX	Homeobox Transkriptionsfaktoren
HOMF	Homeodomain Transkriptionsfaktoren
kg	Kilogramm
KG	Körpergewicht
Konz.	Konzentration
LDL	low density lipoprotein
min	Minute
miRNA	microRNA
ml	Milliliter
mM	Millimolar
mRNA	messenger RNA
MPF	Mitosis promoting factor
n	Anzahl
NKX6	Homeobox Transkriptionsfaktoren
nm	Nanomol
P	Wahrscheinlichkeit
PBS	Phosphate Buffered Saline
PCNA	Proliferating cell nuclear antigen

PDGF	platelet derived growth factor
RNA	Ribonukleinsäure
rpm	rounds per minute
RXRF	Retenoid X Rezeptor
sek	Sekunde
SMC	Smooth Muscle Cell
TNF- α	Tumor Nekrose Faktor- α
VSMC	Vascular smooth muscle cells
z.B.	zum Beispiel

9. Publikationen

9.1 Veröffentlichungen

MicroRNAs Regulate Smooth Muscle Cell Function During Neointima Formation

Bielenberg W, Prock A, Stieger P, Tillmanns H, Sedding DG
(in Vorbereitung)

miR-143/145 – Proproliferative Keyplayers During Vascular Proliferative Diseases

Bielenberg W, Prock A, Stieger P, Tillmanns H, Sedding DG
(in Vorbereitung)

MicroRNA 146a Regulates Neointima Lesion Formation

Bielenberg W, Tillmanns H, Sedding DG
(in Vorbereitung)

9.2 Vorträge und Posterpräsentationen

9.2.1 Vorträge

miRNA-dependent Regulation of Smooth Muscle Cell Function

Bielenberg W, Prock A, Stieger P, Tillmanns H, Sedding DG
International Society on Thrombosis and Haemostasis Congress 2009, Boston;
USA
11. - 16. Juli 2009

miRNAs regulieren die Funktion glatter Gefäßmuskelzellen während der Atherosklerose und Restenose

Bielenberg W, Prock A, Stieger P, Tillmanns H, Sedding DG
115. Kongress der Deutschen Gesellschaft für Innere Medizin, Wiesbaden
18 - 22. April 2009

Impact of the miRNA-processing enzymes Dicer and Drosha on Smooth Muscle Cell Function and Vascular Lesion Formation

Bielenberg W, Prock A, Stieger P, Tillmanns H, Sedding DG
75. Jahrestagung der deutschen Gesellschaft für Kardiologie, Mannheim
16. 18. April 2009

miRNA-dependent Regulation of Smooth Muscle Cell Function during Neointima Formation

Bielenberg W, Prock A, Stieger P, Tillmanns H, Sedding DG
American Heart Association Scientific Session, New Orleans, Louisiana; USA
08. – 12. November 2008

miRNA-abhängige Regulation der Funktion Glatter Gefäßmuskelzellen

Bielenberg W, Prock A, Stieger P, Vogel S, Tillmanns H, Sedding DG
74. Jahrestagung der deutschen Gesellschaft für Kardiologie, Mannheim
27. März - 29. März 2008

9.2.2 Posterpräsentationen

miRNAs Regulate Smooth Muscle Cell Function During Neointima Formation

Bielenberg W, Prock A, Stieger P, Tillmanns H, Sedding DG
European Society of Cardiology Congress 2009, Barcelona; Spanien
29. August – 02. September 2009

miRNA Expressionsprofile während vaskuloproliferativer Erkrankungen

Bielenberg W, Tillmanns H, Sedding DG
115. Kongress der Deutschen Gesellschaft für Innere Medizin, Wiesbaden
18 - 22. April 2009

miRNA-dependent regulation of smooth muscle cell function during neointima formation

Bielenberg W, Prock A, Stieger P, Tillmanns H, Sedding DG
Kongress der Deutschen Physiologischen Gesellschaft 2009, Gießen
22. – 25. März 2009

miRNA-dependent Regulation of Smooth Muscle Cell Function during Neointima Formation

Bielenberg W, Prock A, Stieger P, Tillmanns H, Sedding DG
Eingeladenes Poster zur ATVB Early Career Session 2008,
American Heart Association Scientific Session, New Orleans, Louisiana; USA
08. – 12. November 2008

miRNA-dependent Regulation of Smooth Muscle Cell Function during Neointima Formation

Bielenberg W, Prock A, Stieger P, Tillmanns H, Sedding DG
European Society of Cardiology Congress 2008, München
31. August - 03. September 2008

miRNA-abhängige Regulation der Funktion Glatter Gefäßmuskelzellen während der Entstehung der Atherosklerose und Restenose

Bielenberg W, Prock A, Stieger P, Vogel S, Tillmanns H, Sedding DG
114. Kongress der Deutschen Gesellschaft für Innere Medizin, Wiesbaden
29. März - 02. April 2008

9.2.3 Ko-Autorenschaften

Role of Extracellular RNA on Vascular Permeability, Edema Formation and Myocardial Infarction Size

P. Stieger, S. Fischer, W. Bielenberg, A. Prock, D. Gündüz, C. Neuhof, H.-H. Tillmanns, K. T. Preissner, D. G. Sedding
European Society of Cardiology Congress 2009, Barcelona; Spanien
29. August – 02. September 2009

Einflüsse extrazellulärer RNA auf die vaskuläre Permeabilität, die Ausbildung eines myokardialen Ödems und Gewebsschaden nach Myokardinfarkt

Stieger P, Fischer S, Grebe M, Krämer F, Prock A, Bielenberg W, Preissner KT, Tillmanns H, Sedding DG
115. Kongress der Deutschen Gesellschaft für Innere Medizin, Wiesbaden
18 - 22. April 2009

The Regulator of G Protein Signalling (RGS) 5 Prevents Cell Cycle Entry and Proliferation of Smooth Muscle Cells and Attenuates Neointima Formation

A. Prock, W. Bielenberg, P. Stieger, H.-H. Tillmanns, W. Schaper, D. G. Sedding
75. Jahrestagung der deutschen Gesellschaft für Kardiologie, Mannheim
16. 18. April 2009

Role of Extracellular RNA on Vascular Permeability, Edema Formation and Myocardial Infarction Size

P. Stieger, S. Fischer, W. Bielenberg, A. Prock, D. Gündüz, C. Neuhof, H.-H. Tillmanns, K. T. Preissner, D. G. Sedding
75. Jahrestagung der deutschen Gesellschaft für Kardiologie, Mannheim
16. 18. April 2009

The "regulator of G protein signaling 5" (RGS5) prevents cell cycle entry and proliferation of smooth muscle cells and attenuates neointima formation

Prock A, Bielenberg W, Vogel S, Stieger P, Wiegand B, Tillmanns H, Sedding DG
Kongress der Deutschen Physiologischen Gesellschaft 2009, Gießen
22. – 25. März 2009

The Regulator of G Protein Signaling5 (RGS5) Prevents Cell Cycle Entry and Proliferation of Smooth Muscle Cells and Attenuates Neointima Formation

Prock A, Bielenberg W, Vogel S, Stieger P, Wiegand B, Tillmanns H, Sedding DG
American Heart Association Scientific Session, New Orleans, Louisiana; USA
08. – 12. November 2008

The Regulator of G Protein Signaling5 (RGS5) Prevents Cell Cycle Entry and Proliferation of Smooth Muscle Cells and Attenuates Neointima Formation

Prock A, Bielenberg W, Vogel S, Stieger P, Wiegand B, Tillmanns H, Sedding DG

European Society of Cardiology Congress 2008, München

31. August - 03. September 2008

Depletion of Extracellular RNA Reduces Vascular Permeability Edema Formation and Myocardial Infarction Size

Stieger P, Fischer S, Grebe M, Krämer F, Prock A, Bielenberg W, Preissner KT, Tillmanns H, Sedding DG

European Society of Cardiology Congress 2008, München

31. August - 03. September 2008

Die Reduktion von Extrazellulärer RNA Verringert die Vaskuläre Permeabilität, Ödembildung und Myokardinfarktgröße

Stieger P, Fischer S, Grebe M, Krämer F, Prock A, Bielenberg W, Preissner KT, Tillmanns H, Sedding DG

74. Jahrestagung der deutschen Gesellschaft für Kardiologie, Mannheim

27. März - 29. März 2008

9.3 Preise

Young Investigator Award

International Society on Thrombosis and Haemostasis Congress 2009, Boston; USA

12. - 16. Juli 2009

1. Preis des Young Investigator Awards

115. Kongress der Deutschen Gesellschaft für Innere Medizin, Wiesbaden

18. - 22. April 2009

Travel Award

08/2008, MBML

Posterpreis

114. Kongress der Deutschen Gesellschaft für Innere Medizin, Wiesbaden

29. März - 02. April 2008

**Der Lebenslauf wurde aus der elektronischen
Version der Arbeit entfernt.**

**The curriculum vitae was removed from the
electronic version of the paper.**

11. Danksagung

Herrn Prof. Dr. med. H. Tillmanns danke ich für die breite Unterstützung und Förderung wissenschaftlichen Arbeitens in seiner Abteilung, in deren Rahmen diese Arbeit entstehen konnte.

Besonders möchte ich mich zudem bei Herrn Prof. Dr. Wolfgang Clauss bedanken, der hilfsbereit und spontan die Betreuung meiner Doktorarbeit übernommen hat und mir immer mit Rat zur Seite stand.

Mein ganz besonderer Dank gilt Herrn Priv. Doz. Dr. med. Daniel Sedding für das spannende und aktuelle Thema und die engagierte Betreuung während meiner Doktorarbeit, aber auch für die Möglichkeit zum unabhängigen Arbeiten. Er hat mich durch die fortwährende wissenschaftliche Diskussion, seine Ideen und engagierte Betreuung den Zugang zu wissenschaftlichen Fragestellungen gelehrt. Mein Dank gilt ihm auch für die kritische Durchsicht der Arbeit und die Möglichkeit, mein Projekt auch international vorstellen und verteidigen zu dürfen.

Ich freue mich besonders, meine Arbeit in seinem Labor, das sich durch höchsten wissenschaftlichen Anspruch und eine gleichzeitig beispiellose Arbeitsatmosphäre auszeichnet, fortsetzen zu können.

Für den immer schnellen fachlichen Rat bei Problemen mit der real-time PCR möchte ich mich ganz herzlich bei Dr. Jochen Wilhelm und Dr. Grazyna Kwapiszewska-Marsh bedanken, die sich immer Zeit für mich und meine Probleme genommen haben.

Außerdem möchte ich mich bei Steffi Wolfram bedanken, die mich die ganzen 3 Jahre begleitet hat und mich in viele Methoden des Labors eingeführt hat.

Meinen Mitdoktoranden Philipp Stieger, André Prock und Jan-Marcus Daniel, sowie unserer Postdoc Rebecca Widmer-Teske danke ich, dass sie mir meine Arbeitstage regelmäßig auflockern/aufgelockert haben, bei Problemen immer ein offenes Ohr haben und auch dafür sorgen, dass der tägliche Spaß bleibt; dazu gehören jetzt auch unsere neuen Doktorandinnen Christiane Thölen und Tina Jores, die für frischen Wind im Labor sorgen.

Meinen Freunden, besonders Meike Winkler, Ewa Jablonska und Gabor Kovacs, möchte ich danken, dass sie sich geduldig immer wieder mal Tiraden über meine Problemversuche angehört haben, mich immer wieder aufgebaut und motiviert haben und immer für mich da sind.

Erklärung

Ich erkläre: „Ich habe die vorgelegte Dissertation selbständig, ohne unerlaubte fremde Hilfe und nur mit den Hilfen angefertigt, die ich in der Dissertation angegeben habe. Alle Textstellen, die wörtlich oder sinngemäß aus veröffentlichten oder nicht veröffentlichten Schriften entnommen sind und alle Angaben, die auf mündlichen Auskünften beruhen, sind als solche kenntlich gemacht.

Bei den von mir durchgeführten und in der Dissertation erwähnten Untersuchungen habe ich die Grundsätze guter wissenschaftlicher Praxis, wie sie in der „Satzung der Justus-Liebig-Universität Gießen zur Sicherung guter wissenschaftlicher Praxis“ niedergelegt sind, eingehalten.“